

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio del papel de las interacciones Eph-ephrin en los
microambientes de médula ósea en la leucemia linfática crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paula Fortea Gordo

Director

Luis Miguel Alonso Colmenar

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA



*Estudio del papel de las interacciones Eph-ephrin
en los microambientes de médula ósea
en la leucemia linfática crónica*

TESIS DOCTORAL
PAULA FORTEA GORDO

Dirigida por Luis Miguel Alonso Colmenar

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Biología

***Estudio del papel de las interacciones Eph-ephrin
en los microambientes de médula ósea
en la leucemia linfática crónica***

Dr. Luis Miguel Alonso Colmenar, certifica que **Dña. Paula Fortea Gordo**, Licenciada en Bioquímica ha realizado este trabajo bajo su dirección, en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid, y considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Biología.

Vº Bº del DIRECTOR

Fdo.: Luis Miguel Alonso Colmenar

La interesada,

Fdo.: Paula Fortea Gordo

AGRADECIMIENTOS

Al fin, parecía que no iba a llegar nunca pero aquí está mi Tesis impresa. Se cierra una etapa muy importante que no hubiera sido posible sin la ayuda de mucha gente que me ha ayudado a crecer como investigadora y sobre todo como persona.

Quiero agradecerle a Agustín que me diese la oportunidad de incorporarme a su grupo, sus continuos esfuerzos por conseguir que todos los que trabajamos con él tuviésemos los medios para terminar cada proyecto, aunque cada vez se pusiesen más difíciles las cosas, y sobre todo el cariño y confianza que me ha transmitido siempre.

A Luis, mi director, gracias por haberme enseñado a trabajar de forma minuciosa en el laboratorio, que los pequeños detalles de un experimento pueden ser muy importantes. Por su ilusión en hacer ciencia y conseguir resultados que realmente tuviesen un significado, por hacerme ver que los resultados son los que son y no hay que tener miedo a ir en contra de lo establecido.

A mis compañeros del CAI. No se ni por quien empezar. Me siento muy afortunada de haber compartido estos años con un grupo humano tan fantástico, de los que me llevo muchas enseñanzas técnicas, pero sobre todo buenos amigos. Amalia, gracias por tu inmenso cariño, por tu alegría cada día, más aún en momentos que no han sido tan alegres, por tus consejos y por estar siempre ahí. Alfonso, gracias por ser una de las mejores personas que he conocido, por estar siempre dispuesto a echar una mano, en el microscopio o en lo que hiciese falta, por tu cariño. Carmencita, quien me iba a decir que esa persona que empezó regañándome por no dejar el laboratorio o los citómetros recogidos cuando acabábamos a las tantas, se iba a convertir en un apoyo fundamental. Gracias por las broncas, casi siempre con razón, y por permitirme ser de las personas que saben que es todo fachada y eres una buenaza. Muchísimas gracias a Juanjo, por las eternas conversaciones científicas o no científicas, por tu capacidad de análisis y observación, porque sea cual sea el problema, he aprendido que “hay que tener en cuenta dos cosas” y por que se que puedo contar contigo. A los últimos en integrarse en este grupo tan

diverso, Carlos y Sonia, muchas gracias por vuestro apoyo, por todas las conversaciones cinéfilas, con punto friki, tan necesarias para desconectar del laboratorio.

A Eva, por los comienzos, por transmitirme su gran capacidad de trabajo, no sabes cuanto me estoy acordando de ti en esta última etapa. A Tere, por enseñarme desde el principio lo importante que era aprovechar al máximo esta etapa de aprendizaje, pero también por recordarme que en esta locura de profesión, la tesis solo es una parte de tu vida.

A todos mis compañeros de Medi. A los mayores, Nines, Alberto, Rosa, Eva y Miriam, por la envidia sana que da la familia científica que habéis formado. Por hacerme sentir una pequeña parte de ella. A los becarios, aunque ya casi todos seáis doctores jeje, gracias a Víctor, Laura Jaris, Ana y Lidia por hacer tan fácil colaborar con vosotros, por estar siempre al otro lado del teléfono dispuestos a echar un cable, por un montón de charlas sobre curro y ciencia, aunque algunas fueran con unas cañas de más, en reuniones no científicas tan necesarias también.

A los chicos de Bio, David y Vito, gracias por vuestro apoyo desde los comienzos, por las charlas que hacían más amena la espera en el citómetro. A Sara, por tanto tiempo compartido en paralelo, alegrías y nervios, mucha suerte en esta etapa que comienza para las dos. A los compañeros del departamento de biología celular, con los que pase muy buenos momentos en las prácticas en mi primera experiencia en la docencia.

A los compañeros del CAI de genómica y proteómica, en especial a Jesús y a Rosa. Gracias por su ayuda y sus consejos para poner a punto las qPCR.

Hay compañeros que son mucho más que eso. Gracias a Esther, por ser una amiga y un apoyo importantísimo, en el laboratorio y fuera de él. Porque siempre podía contar contigo para desahogarnos y charlar de alegrías y penas. Por seguir estando ahí, ahora al otro lado del teléfono, para tratar de solucionar

cualquier duda de esta etapa *pre-tésica*... A Miguel, gracias porque estos años no hubieran sido lo mismo sin ti, no habría podido tener un compañero mejor. Por hacer los días en el laboratorio mucho más divertidos, por tener siempre un comentario capaz de arrancarme una carcajada. Por ser tan buena gente y ayudarme a calmar mi estrés en tantos momentos, por tu cariño. Porque ha sido todo un lujo conocerte, y la tesis me ha dado un amigo en México al que pienso visitar muy pronto. Sobre todo porque además del doctorado en biología me he sacado el de traducción mexicano-español!

Quiero agradecerle a María Eugenia Miranda la oportunidad de incorporarme a su línea de investigación, por hacer que me ilusionase con un nuevo proyecto, por su apoyo estos últimos meses y porque un poco de lo que sigo aprendiendo se vea reflejado también en el manuscrito.

Todo esto no habría sido posible sin el apoyo de mi familia. Gracias a mis padres por enseñarme desde pequeña la importancia de formarse y aprender por encima de todo y que todo esfuerzo tiene su recompensa. Por haberme transmitido la curiosidad por las cosas y su enorme capacidad de trabajo y compromiso con lo que uno hace. Por escucharme y por sus consejos en los momentos en los que me dejaba ganar por los nervios. A mi hermana, gracias Bixo por tu apoyo siempre, por estar orgullosa de mis logros y por hacerme estarlo de los tuyos, por el nivel de exigencia que le pones a cada cosa que haces, por seguir creciendo juntas. Os quiero muchísimo. Gracias a mis abuelos, a las que están y a los que de cualquier forma siempre me acompañan. Por ser una parte fundamental de mi vida y porque se lo felices que os haría poder compartir este momento importante conmigo.

A Carlos, Luisa y Ana. Gracias por su apoyo todos estos años, por interesarse en cada una de las etapas de esta tesis. Por su cariño.

A mis "bioquis", porque empezamos siendo compañeros y os habéis convertido en amigos irreemplazables. Por haber vivido juntos estos años de doctorado. Lendínez, por tu capacidad de no estresarte nunca, ni por un examen de metabolismo ni por la tesis, por ser capaz de relativizar. A Javi

Frías, porque los meses que pasamos en Viena no los voy a olvidar nunca, porque te echo mucho de menos. A Moni, por todas las veces en las que hemos despotricado de esta locura de la tesis con unas cervezas, por transmitir tu energía desbordante. Heidi, o Laura, que nos hacemos mayores jeje, por estar conmigo desde el primerísimo día de carrera, hasta ahora que llegamos a ser doctoras casi a la vez. Porque eres una valiente y por tu capacidad de priorizar las cosas realmente importantes. Ale, gracias por tus consejos y tu apoyo todo este tiempo y sobre todo en la última etapa. Por entenderme y por saber que siempre puedo contar contigo. Alfon, muchísimas gracias por ser simplemente así, no muy simpático pero un amigo con todas las letras. Por tu increíble apoyo estos últimos meses.

A mis amigos, los de siempre y los que poco a poco se han convertido en parte fundamental de mi vida. Sois muchos y no puedo nombraros a todos. En especial, gracias Elena por tu apoyo, porque somos muy distintas y hemos podido estar separadas a veces, pero a la hora de la verdad siempre estás ahí, al otro lado del teléfono para hablar de lo que haga falta. Gracias a Susana, porque hace casi 30 años que superamos etapas juntas, y espero seguir haciéndolo muchos años más. Muchísimas gracias Isa, porque tu optimismo ante la vida es envidiable, por transmitírmelo en los momentos más difíciles, por estar siempre a mi lado, por muchas más cervezas juntas. A todos con los que he compartido risas y ratos de desconexión con unas cañas en el barrio, porque no sabéis lo importantes que han sido para mi vuestro interés y vuestros ánimos. Porque a partir de ahora no me voy a perder ningún aperitivo.

A Carlos, ¡por fin leemos la Tesis! Gracias por estar orgulloso de mí y transmitírmelo cada día. Por tu paciencia y también por tu impaciencia todos estos años. Por animarme siempre, hasta cuando yo no podía más. Por quererme y por querer compartir tu vida conmigo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
1.- LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA	1
1.1.- Definición. Características clínicas más relevantes	1
1.2.- Importancia del microambiente en la LLC	6
1.2.1.- Distintos tipos celulares conforman el estroma de médula ósea capaz de sustentar la viabilidad de las células LLC	7
1.2.2.- Estrategias terapéuticas para tratar de interrumpir la comunicación entre las células LLC y el microambiente	10
2.- LA FAMILIA DE RECEPTORES Y LIGANDOS TIROSIN-KINASA EPH/EPRIN	12
3.- LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES DEL TNF EN LA LLC	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	21
1.- PACIENTES	21
2.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	21
2.1.- Aislamiento de las células leucémicas en sangre	21
2.2.- Procesamiento de biopsias de médula ósea	22
3.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE Eph/ephrin MEDIANTE RT-qPCR	23
3.1.- Aislamiento de ARN	23
3.2.- PCR cuantitativa	24
4.- ENSAYOS IN VITRO. CULTIVOS CELULARES	24
4.1.- Cultivos de células de estroma de médula ósea de pacientes LLC y de donantes sanos	24
4.2.- Cultivos de las líneas de estroma de médula ósea Hs5 y Hs27	25
4.3.- Cultivos de células LLC. Ensayos funcionales	25
4.3.1.- Ensayos con proteínas recombinantes Eph/Ephrin-Fc	25
4.3.2.- Cultivos de células LLC con distintos estímulos	26
4.3.3.- Ensayos de bloqueo de la señalización mediada por moléculas de la familia BAFF	27
4.3.4.- Co-cultivos estroma-LLC. Ensayos de supervivencia	27
4.3.5.- Co-cultivos en placas Transwell	29
4.3.6.- Ensayos de supervivencia frente a fármacos citostáticos	29
4.3.7.- Ensayos de adhesión linfocito-estroma. Análisis de conjugados	30
4.3.8.- Cultivos de HUVEC	31
5.- SILENCIAMIENTO EphB4/EphrinB2 CON siRNA	32
5.1.- Transfección BMSCL con siRNA para EphB4	32

5.2.- Nucleofección células LLC con siRNA para EphrinB2	32
6.- ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	33
7.- MICROSCOPIA CONFOCAL	34
7.1.- Adquisición y análisis de imágenes	34
7.2.- Inmunofluorescencia en biopsias de médula ósea	34
8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
RESULTADOS	37
1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE EPH/EPHRIN EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES DE LLC Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN TISULAR, FACTORES PRONÓSTICO Y LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	37
1.1.- Análisis mediante qPCR de la expresión de Eph/ephrin en células LLC obtenidas de sangre periférica y médula ósea de los pacientes	37
1.2.- Confirmación de los resultados obtenidos por qPCR, a nivel de proteína mediante análisis por citometría de flujo	40
1.3.- Análisis de la expresión de Eph/ephrin en médula ósea en relación con las características clínicas de los pacientes	42
2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES QUE SUSTENTAN VIABILIDAD DE LAS LLC IN VITRO, POR SU POSIBLE PAPEL IN VIVO, DE SU EXPRESIÓN DE Eph/ephrin EN RELACIÓN CON EL DE LAS LLC Y SI LOS MISMOS INTERVIENEN TAMBIÉN EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS	48
2.1.- Análisis del papel de los endotelios en la supervivencia de las LLC	48
2.2.- En LLC, las células mesenquimales son el tipo celular mayoritario que conforma el microambiente de médula ósea	52
2.3.- Las células mesenquimales del estroma de médula ósea (BMMSC) de pacientes de LLC sobre-expresan VCAM-1, CXCL12, BAFF y APRIL frente a las derivadas de donantes sanos	54
2.4.- Las BMMSC derivadas de pacientes LLC expresan altos niveles de EphB4	57
2.5.- Las BM-MSCEphB4 positivas están presentes en la médula ósea de los pacientes LLC	59
2.6.- Existe una expresión diferencial de EphB4 en médula ósea relacionada con el patrón de infiltración	61
2.7.- Linfocitos Ki67+ se encuentran alejados de las BMMSC-EphB4+	65
3.- ANÁLISIS DEL PAPEL DE LAS INTERACCIONES Eph/ephrin EN LA SUPERVIVENCIA Y/O RESISTENCIA A FÁRMACOS	67
3.1.- Las interacciones homotípicas entre Eph-ephrin B en las células LLC modulan su supervivencia. Importancia de la señalización reverse a través de ephrinB2	67
3.2.- La expresión de ephrinB2 en las células LLC de médula ósea es	72

dependiente del microambiente y del contacto con las células de estroma	
3.3.- El contacto de las células LLC ephrinB2high induce la señal forward a través de EphB4 en el estroma, potenciando la adhesión entre ambos tipos celulares y la retención de los linfocitos en la médula ósea	74
3.4.- La señal forward a través de EphB4 induce la producción de factores solubles que sostienen la supervivencia de las células LLC	79
3.5.- La señalización forward a través de EphB4 inducida por las células ephrinB2high modifica las propiedades del estroma generando un microambiente que proporciona resistencia frente a los tratamientos con fármacos	84
4.- PAPEL DE LAS INTERACCIONES Eph/ephrin EN LA SUPERVIVENCIA/RESISTENCIA FÁRMACOS, A TRAVÉS DE OTROS MECANISMOS DE CRECIENTE INTERÉS EN LA ENFERMEDAD, ESPECIALMENTE LA FAMILIA BAFF/APRIL, LA SEÑALIZACIÓN VÍA INTEGRINAS Y BCR/CD40	87
4.1.- La expresión de ephrinB2 en las LLC-MO y la supervivencia de las mismas es dependiente de la interacción con VCAM-1, BAFF y APRIL	87
4.2.- El papel de VCAM-1 en la supervivencia de las LLC-MO es independiente de la expresión de EphB4	89
4.3.- La estimulación de las LLC-MO a través del BCR y de CD40 induce la proliferación de una sub-población con expresión intermedia de ephrinB2	91
4.4.- EphrinB2 sostiene la ruta autocrina de supervivencia mediada por BAFF/APRIL en las células LLC de médula ósea	93
4.5.- La inducción de la señal forward en BMSC activa una ruta paracrina de supervivencia que sostiene la viabilidad de las células LLC-MO	100
DISCUSIÓN	105
1.- EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE Eph/ephrin DIFIERE ENTRE LOS COMPARTIMENTOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA	106
2.- EL PAPEL DE ephrinB2 EN EL NICHOS TUMORAL DE MÉDULA ÓSEA EN LA LLC	109
3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES Y DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS MISMOS QUE CONFORMAN EL MICROAMBIENTE DE MÉDULA ÓSEA EN LA LLC. PAPEL DE EphB4	113
4.- PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN EphB4-ephrinB2 EN EL NICHOS TUMORAL DE LA LLC	118
5.- RELACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN EphB4-ephrinB2 CON OTRAS RUTAS IMPLICADAS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS LLC. IMPORTANCIA DE LA FAMILIA BAFF	123
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	135

SUMMARY	151
RESUMEN	163
PUBLICACIONES	175

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

7 AAD	7 AminoActinomicina D
APC	Aloficocianina (Alophicocianina)
APRIL	A-Proliferating Inducing Ligand
ARN	Ácido Ribo Nucleico
ARNm	ARN mensajero
-b	Biotina
BAFF	B-Cell Activating Factor
BAFF-R	B-Cell Activating Factor Receptor
BCMA	B-Cell Maturation Antigen
BCR	B-Cell Receptor
BMMSC	Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells
BSA	Albúmina bovina (Bovine Serum Albumin)
CAM	Moléculas de adhesión celular (Cell Adhesion Molecules)
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of Differentiation)
CXCR	Receptor de quimioquinas CXC (CXC chemokine Receptor)
d	Delección
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)
Eph	Erythropoietin producing hepatocellular carcinoma

Ephrin	Eph receptor interacting protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
FDC	Follicular Dendritic Cells
FITC	Fluorescein isothiocyanate, isotiocianato de fluoresceína
h Fc	Fragmento Constante de Inmunoglobulinas humanas
FN	Fibronectina
GL	Ganglio Linfático
HUVEC	Células endoteliales de vena procedentes de cordón Umbilical humano (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 (Inter-Cell Adhesion Molecule-1)
IGVH	Región variable del gen la cadena pesada de inmunoglobulinas (Immunoglobulin Heavy chain Variable)
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
M	Mutado (Mutated)
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEC	Matriz Extra Celular
MO	Médula Ósea
NLC	Nurse Like Cells
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos (Phosphate Buffered Saline)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PE	Ficoeritrina (Phicoerithrin)
PECy5	Ficoeritrina cianina 5 (Phicoerithrin Cyanine 5)
rh	Recombinante humana
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Reacción reversa en cadena de la polimerasa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
SAV	Estreptoavidina (Streptavidin)
siRNA	ARN pequeños de interferencia (small interfering Ribonucleic Acid)
SLPC	Síndromes Linfoproliferativos Crónicos
SP	Sangre Periférica
TACI	Transmembrane Activator and CAML Interactor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α (Tumor Necrosis Factor- α)
tri12	Trisomía 12
UM	No mutado (Unmutated)
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)

INTRODUCCIÓN

1.- LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

1.1.- Definición. Características clínicas más relevantes

La leucemia linfática crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo caracterizado por la acumulación de linfocitos B en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios (Moreno y cols., 2008). Esta patología representa la leucemia más frecuente en la población occidental. Su incidencia es similar en Europa y Estados Unidos, variando entre 4-6 casos por cada 100.000 habitantes, por año.

Las células LLC derivan de la expansión clonal de linfocitos B maduros, CD19 positivos con expresión característica de CD5, y CD23, baja expresión de CD20 y ausencia de CD10. Estas particularidades permiten distinguir esta leucemia del linfoma de células del manto, que expresan CD5 pero no CD23, y de linfomas foliculares o de células grandes, en los que si se detecta CD10. Además, estas células expresan bajos niveles de inmunoglobulinas en su membrana, principalmente IgM y/o IgD y raramente IgG o IgA. El análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo de muestras de sangre periférica permite el diagnóstico de la enfermedad. Las biopsias de ganglios linfáticos, practicadas por una necesidad clínica, muestran la presencia de pseudofolículos o centros linfoproliferativos compuestos por células de mayor tamaño, rodeados de una masa de células pequeñas (Ponzoni y cols., 2011). En la médula ósea el grado de infiltración representa más de un 30% de la celularidad (Hallek y cols., 2008).

Al contrario que en otros desórdenes linfoproliferativos, en la LLC no existe una alteración genómica específica responsable de la patogénesis. Sin embargo, tecnologías como la hibridación *in situ* unida a fluorescencia (en inglés, FISH) han mostrado que hasta en un 80% de los casos de LLC se encuentran alteraciones cromosómicas que suponen factores pronóstico independientes. La delección del brazo largo del cromosoma 13 (del13q14), se encuentra en el 50% de los pacientes y en general se asocia a un mejor

pronóstico cuando se presenta de forma aislada. Trabajos recientes han relacionado esta alteración con una actividad tumor supresora en un mecanismo que implica el incremento de la expresión de Bcl2 (Cimmino y cols., 2005). La trisomía del 12 se detecta en un 10-20% de los casos y las últimas técnicas de secuenciación han encontrado un vínculo con la mutación de NOTCH1. La delección del brazo largo del cromosoma 11 (del11q22-q23) aparece en 5-20% de los pacientes y se asocia con peor pronóstico ya que en esta región se encuentra el gen inmunosupresor ATM (Stankovic y cols., 1999). Por último, los pacientes en los que se identifica la delección del brazo corto del cromosoma 17 (del17p) pertenecen al grupo de riesgo más elevado. Esta mutación implica al gen supresor TP53 y a pesar de que sólo se detecta en un 10% de los casos, su prevalencia aumenta a lo largo del desarrollo de la enfermedad. Más aún es la única característica genómica que determina claramente el manejo clínico del enfermo.

El diagnóstico de la enfermedad se realiza en la mayoría de los casos por la detección de elevada linfocitosis ($>5 \times 10^9$ linfocitos-B/L) en un análisis de sangre rutinario, sin otros síntomas relevantes. Sin embargo, su desarrollo a lo largo del tiempo es muy heterogéneo. Aproximadamente un tercio de los pacientes no llegan a requerir nunca tratamiento y conviven con la enfermedad. Por el contrario, un 30% de los individuos diagnosticados precisan tratamiento poco tiempo después debido a anemia, trombocitopenia, el desarrollo de adenopatías o esplenomegalia. En estos casos la esperanza de vida se reduce drásticamente (2-3 años). Por último, existe un grupo de pacientes que recibe tratamiento contra distintos síntomas relacionados con la enfermedad, a tiempos variados.

En la actualidad, dos sistemas de clasificación, basados en el grado de linfocitosis y el examen físico, se aplican para tratar de definir el pronóstico y necesidad de tratamiento de los pacientes LLC. El sistema de estadios propuesto por Binet (Binet y cols., 1981) define 3 categorías en función del número de sitios linfoides afectados y los recuentos sanguíneos (Tabla 1). El sistema de estadios de Rai se propuso en 1975 (Rai y cols., 1975)

estableciendo cinco grupos en base al tiempo transcurrido hasta la progresión en la enfermedad. Este sistema fue modificado (Rai y cols., 1990) de forma que en la actualidad se consideran 3 niveles de riesgo como se muestra en la Tabla 2, y es el más utilizado en la práctica clínica, junto con el tiempo necesario para doblar la carga linfocitaria (Molica y cols., 1990). Mientras que los estadios tempranos se caracterizan por un periodo largo de supervivencia libre de progresión en la enfermedad, en estadios avanzados este tiempo se acorta sensiblemente.

ESTADIOS BINET	CARACTERÍSTICAS
A	Hasta 2 sitios linfoides infiltrados. Ausencia de anemia (Hb > 10g/dL) o trombocitopenia (Plt > 100000/mm ³).
B	Más de 2 sitios linfoides infiltrados. Ausencia de anemia (Hb > 10g/dL) o trombocitopenia (Plt > 100000/mm ³).
C	Independientemente de los sitios linfoides infiltrados, presencia de anemia (Hb < 10g/dL) o trombocitopenia (Plt < 100000/mm ³).

Tabla 1. Clasificación de la leucemia linfática crónica en base al sistema de estadios de Binnet.

ESTADIOS RAI	CARACTERÍSTICAS
Riesgo bajo	Elevada linfocitosis en sangre periférica e infiltración en médula ósea
Riesgo intermedio	Presencia de linfadenopatías o esplenomegalia
Riesgo alto	Presencia de anemia y trombocitopenia

Tabla 2. Clasificación de la leucemia linfática crónica en base al sistema de estadios de Rai modificado.

Los tratamientos actuales inducen, en la mayoría de los casos, remisión de la enfermedad, pero la persistencia de una población residual, protegida dentro de los nichos de médula ósea y ganglios linfáticos, resistente a los tratamientos, hace que la LLC aún sea una enfermedad incurable. Más aún, se ha demostrado que el inicio precoz del tratamiento no siempre es beneficioso. Los agentes inmuno-quimioterapéuticos empleados incentivan la aparición de infecciones, dado que la respuesta inmune, tanto humoral como celular, de los pacientes LLC ya es deficiente por sí misma (Morrison, 2010). Además la quimioterapia podría influir en la selección de clones más agresivos (ej: TP53), con mayor resistencia a los tratamientos, tras las recidivas (Gaidano y cols., 2012).

La búsqueda de nuevos factores pronóstico, no solo de la evolución de la enfermedad, sino también de la respuesta a los tratamientos, ha sido constante en la LLC. Además del sistema de estadios descrito previamente, otros parámetros clínicos son analizados para tratar de determinar el comportamiento de la enfermedad en cada paciente. Entre ellos, destacan los valores de $\beta 2$ microglobulina, LDH, timidin-quinasa en suero y CD23 soluble, así como el tipo de infiltración en médula ósea. Sin embargo, deben tomarse con cuidado puesto que su relación con la carga tumoral puede generar un factor de confusión al diagnóstico.

El número de marcadores biológicos que han probado ser factores pronóstico, sigue creciendo en los últimos años. Además de las alteraciones genómicas nombradas anteriormente, la expresión de ciertas moléculas como CD38 y la subunidad $\alpha 4$ de la integrina VLA-4 (CD49d), fundamentales en la interacción de las células LLC con otros tipos celulares del microambiente (Brachtl y cols., 2014), y marcadores intracelulares como ZAP70, se ha correlacionado con un peor pronóstico (Crespo y cols., 2003). Sin embargo, la dificultad para estandarizar su determinación, ha hecho que su relevancia en la práctica clínica no se haya consolidado. Por encima de todas ellas, el factor biológico que ha demostrado una clara asociación con el pronóstico de la enfermedad es el estado mutacional de los genes que codifican para la región

variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGVH), de forma que los pacientes que presentan ausencia de mutación en IGVH tienen una evolución mucho peor (Hamblin y cols., 1999). Actualmente la tecnología permite determinar estas mutaciones de forma rápida y confiable por lo que su aplicación está ampliamente extendida.

La presencia de mutaciones somáticas en los genes IGVH en las células LLC, tiene gran relevancia para entender el origen de la enfermedad. Las células LLC poseen un BCR funcional consecuencia de los reordenamientos productivos de los genes de las inmunoglobulinas (Caligaris-Cappio y cols., 2008). El proceso de hipermutación somática durante la maduración de los linfocitos B, es responsable del aumento de la afinidad de los anticuerpos por los antígenos. Al tener lugar posteriormente al reconocimiento antigénico, se ha propuesto que el encuentro con los mismos podría ser un desencadenante de la patología (Zenz y cols., 2010). La hipermutación somática no tiene lugar de forma homogénea en todos los genes en la LLC, por lo que esta selectividad puede interpretarse como una evidencia más de la presión genética que los antígenos ejercen para originar el repertorio restrictivo del BCR característico de esta enfermedad. Así mismo, la ausencia de mutaciones se puede explicar como una estrategia para mantener el BCR en un estado similar al de la línea germinal. De manera añadida, otra característica de la LLC es la existencia de receptores estereotipados, con alta homología en la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad en las inmunoglobulinas, HCDR3, lo que también sustenta la implicación de estímulos antigénicos específicos en la patogénesis de la LLC (Murray y cols., 2008). La expresión de uno u otro de estos receptores estereotipados puede tener consecuencias en la presentación clínica o en la evolución de la enfermedad. Más aún, se ha descrito que la presencia de estos receptores estereotipados es significativamente más frecuente en los casos de LLC con ausencia de mutaciones somáticas en los genes IGVH (Stamatopoulos y cols., 2007).

1.2.- Importancia del microambiente en la LLC

Al contrario que otros síndromes linfoproliferativos, la expansión de las células LLC no se debe a un alto índice de proliferación. Estas células se encuentran mayoritariamente secuestradas en la fase G0 del ciclo celular y su supervivencia se debe a la existencia de mecanismos de resistencia frente a la apoptosis que implican tanto propiedades intrínsecas a las propias células tumorales, como una expresión muy elevada de proteínas anti-apoptóticas (Kitada y cols., 1998), como factores extrínsecos derivados del microambiente (Burger, 2011). Sin embargo, el hecho de que una vez que las células LLC son extraídas del organismo, su viabilidad en cultivos *in vitro* descienda dramáticamente, da especial relevancia a la dependencia de estas células de señales proporcionadas por otros tipos celulares (Collins y cols., 1989).

Como hemos comentado anteriormente, a pesar de que los distintos tratamientos quimioterapéuticos contra la LLC, combinados con las nuevas estrategias de inmunoterapia han conseguido que la mayoría de los pacientes entren en remisión, la ocurrencia de múltiples recidivas hace evidente que existe una población de células LLC, resistente a los tratamientos, que probablemente se encuentre protegida dentro de órganos linfoides como la médula ósea y también los ganglios linfáticos. Desde hace años, existen múltiples evidencias de la importancia de los contactos directos entre las células LLC y las células del estroma de médula ósea en la resistencia de las primeras a la apoptosis espontánea o inducida por fármacos mediada por fenómenos de adhesión (Lagneaux y cols., 1998, Lagneaux y cols., 1999) (Panayiotidis y cols., 1996). Sin embargo, sigue siendo necesario profundizar en las rutas de señalización activadas por esa interacción.

Por otro lado, la infiltración de distintos tejidos es un proceso activo en el que las células LLC son capaces de modificar la estructura de los órganos, mediante la producción de citoquinas y quimioquinas, hasta llegar a reemplazar las poblaciones celulares originales, creando un microambiente o nicho favorable para el mantenimiento y progresión de la masa tumoral (Plander y

cols., 2011). Mientras que la presencia de adenopatías es variable entre distintos pacientes y en función del estadio de la enfermedad, en todos los individuos en los que se desarrolla la LLC tiene lugar la infiltración de la médula ósea. Ésta puede alcanzar distintos grados, desde un patrón nodular o intersticial en el que se conserva gran parte de la arquitectura original del tejido, a una infiltración masiva o también denominada difusa, en la que ya se ha producido el reemplazo del tejido hematopoyético normal (Rozman y cols., 1984).

En base a estas características, profundizar en el conocimiento de los componentes del microambiente de médula ósea y de la comunicación que se establece entre éstos y las células LLC, es fundamental para el desarrollo de terapias más efectivas que puedan interrumpir estos mecanismos y hacer más accesibles a los fármacos las células albergadas en el nicho tumoral (Burger, 2012).

1.2.1.- Distintos tipos celulares conforman el estroma de médula ósea capaz de sustentar la viabilidad de las células LLC

Múltiples autores han tratado de caracterizar los distintos tipos celulares comúnmente englobados en el término estroma. Entre ellas, se encuentran las denominadas *Nurse Like Cells* (NLCs), células foliculares dendríticas (FDCs), células endoteliales, células estromales de médula ósea de origen mesenquimal (*Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells*, BMMSC) y hasta linfocitos T, y promueven la supervivencia de las células LLC tanto a través de contactos directos como mediante la secreción de factores solubles, involucrando a distintas rutas de supervivencia.

Las NLCs son en sí mismas una modificación de componentes del nicho tumoral inducida por las células leucémicas. Se identificaron por primera vez como células redondeadas de gran tamaño, muy adherentes, que podían observarse después de varios días de cultivo de células mononucleadas extraídas de la sangre de pacientes LLC (Burger y cols., 2000).

Posteriormente se confirmó que derivaban de células mieloides positivas para CD14 (Tsukada y cols., 2002), así como su presencia en los tejidos linfoides de pacientes LLC y en el linfoma folicular (Ruan y cols., 2006). En la LLC se ha descrito como estas células promueven la supervivencia de las LLC mediante la producción de CXCL12 (Burger y cols., 2000), BAFF y APRIL (Nishio y cols., 2005) o al interaccionar mediante CD31 presente en su membrana con CD38 expresado en las células LLC (Deaglio y cols., 2005). Así mismo se confirmó la elevada expresión de CD68 y CD163 en las NLCs de pacientes de LLC frente a las obtenidas de muestras de donantes sanos (Boissard y cols., 2015). Recientemente, se ha mostrado como este tipo celular media la resistencia de las células LLC al tratamiento con Ibrutinib (Boissard y cols., 2015), chlorambucil y dexametasona (Filip y cols., 2015) y su relación con la progresión de la enfermedad, al correlacionar la expresión de CD163 soluble y en membrana con el estado mutacional IGVH, anomalías en el cariotipo o una reducción en la supervivencia de los pacientes libre de progresión (Boissard y cols., 2016).

Los linfocitos T aislados de la sangre de pacientes LLC, muestran ineficacia a la hora de establecer la sinapsis inmunológica con células presentadoras de antígeno. Del mismo modo, en ensayos *in vitro*, el contacto de células LLC con linfocitos T obtenidos de donantes sanos, también provoca que estos linfocitos T pierdan su capacidad de establecer este contacto funcional (Ramsay y cols., 2008). Por tanto, las LLC son capaces de bloquear la respuesta inmune normal de los linfocitos T en el organismo al impedir el reconocimiento de antígenos exclusivos de las células leucémicas. Más aún, el porcentaje de células T reguladoras se encuentra incrementado en los pacientes LLC respecto a los controles sanos (Beyer y cols., 2005). Por otro lado, la interacción entre CD40L y CD40 expresado en la membrana de las células LLC, induce la producción de distintos factores solubles como IL-2, IL-4 e IL-10 que promueven la viabilidad de las células leucémicas (Plander y cols., 2009) y la reentrada en el ciclo celular (Granziero y cols., 2001).

El origen, fenotipo y función de las células foliculares dendríticas (FDCs) ha sido difícil de estudiar debido a su bajo porcentaje en los tejidos linfoides (1%) y a su tendencia a establecer fuertes adhesiones con células B. Aunque ha habido controversia respecto a si su origen estaba en el linaje hematopoyético o en el mesenquimal, parece claro que está ligado a progenitores de células mesenquimales de médula ósea o a miofibroblastos, y en consecuencia, las FDCs expresan marcadores como CD21, CD40, CD73, CD90, CD29, ICAM-1, VCAM-1 y BAFF (Munoz-Fernandez y cols., 2006). Promueven la supervivencia de las LLC a través de la interacción con CD44 que conduce al incremento de la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 (Pedersen y cols., 2002). Así mismo, mediante la secreción de CXCL13 inducen la migración de las células LLC hacia los órganos linfoides (Allen y cols., 2008).

Distintos autores han planteado que las células de los endotelios vasculares pudieran ser otro componente del estroma del nicho tumoral que sustentase la supervivencia de las células LLC in vitro a través del contacto directo con éstas o de la producción de factores solubles desencadenada por el contacto (Moreno y cols., 2001) (Buggins y cols., 2010) (Maffei y cols., 2011). Más aún, se ha descrito que células microvasculares (MVECs) establecen una comunicación con las células leucémicas, de manera que el contacto entre ellas a través de CD40, en la superficie de las MVECs, y CD40L, con expresión aberrante en las LLC, induce una mayor secreción de BAFF y APRIL por parte de las células endoteliales que, a su vez, generan un incremento en la viabilidad de las LLC además de incentivar su expresión de CD40L (Cols y cols., 2012). Los trabajos previos de nuestro laboratorio se habían centrado principalmente en analizar el papel de esta familia de moléculas en la migración de las células LLC a través del endotelio vascular, encontrando que la disminuida capacidad transmigratoria de estas células podía deberse a la sobre-expresión de ephrinA4 en la membrana de las LLC, de forma que la señal reverse inhibe la adhesión de las células leucémicas al endotelio mediada por integrinas (Trinidad y cols., 2009, Trinidad y cols., 2010).

Por encima de todos estos tipos celulares, en la LLC el componente mayoritario del estroma de médula ósea se corresponde con células de origen mesenquimal (BMMSC) (Kurtova y cols., 2009). Estas células están implicadas en la regulación de la hematopoyesis en la condición sana, proporcionando sitios de anclaje a los linfocitos y expresando en su superficie diversos factores de crecimiento (Zhao y cols., 2010). Así mismo, son capaces de rescatar a las LLC de la apoptosis *in vitro* (Lagneaux y cols., 1998). En origen se caracterizaron como células con morfología fibroblástica con capacidad de diferenciar hacia condrocitos, osteoblastos o adipocitos. Su gran plasticidad para dar lugar a distintos tipos celulares sugería que podrían tener un papel importante en la reparación y regeneración de tejidos. Sin embargo, actualmente esta función se atribuye más a la secreción de factores solubles que promueven la proliferación y supervivencia de otras células (Phinney y cols., 2013). Su fenotipo se caracteriza por la ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD11b y CD14, y la expresión de CD73, CD90, CD105 y STRO-1 entre otros (Dominici y cols., 2006). Son capaces de sustentar la viabilidad de las LLC al secretar diversas citoquinas como CXCL12, BAFF y APRIL (Burger y cols., 2002, Pontikoglou y cols., 2013) junto con la interacción a través de moléculas de adhesión (CD44, CD29, CD166...). De forma relevante, igual que ocurre con las NLCs y FDCs, la expresión de VCAM-1 en su membrana les permite interactuar con las células LLC a través de CD49d (Lagneaux y cols., 1999).

1.2.2.- Estrategias terapéuticas para tratar de interrumpir la comunicación entre las células LLC y el microambiente

Las distintas rutas de señalización desencadenadas por la interacción dinámica de las células LLC con los distintos tipos celulares que conforman el estroma, descritos previamente, se relacionan entre sí conformando un complejo microambiente que permite tanto el establecimiento de la enfermedad como la progresión de la misma. Actualmente, se siguen desarrollando estrategias dirigidas tanto a bloquear los contactos intercelulares como a interrumpir las rutas de señalización activadas por éstos. Entre ellas destacan

los antagonistas del receptor CXCR4 que impiden la unión de CXCL12, producido por NLCs y BMMSCs, a las LLC. Compuestos como el plerixafor (AMD3100) han mostrado su eficacia al aumentar la sensibilidad de las células LLC a citostáticos como la Fludarabina (Burger y cols., 2005). De forma similar, la administración de una forma soluble de TACI, Atacicept, ha probado contribuir a la estabilización de la enfermedad al secuestrar los ligandos BAFF y APRIL (Vincent y cols., 2013).

Entre los fármacos que van dirigidos hacia distintos puntos de las rutas de señalización, destacan los inhibidores de phosphatidylinositol-3-kinasa (PI3K), spleen tyrosina kinasa (SYK), Bruton's tyrosina kinasa (BTK) y Bcl-2. La inhibición de PI3K es capaz de contrarrestar los efectos pro-supervivencia de CD40L, BAFF, TNF- α o el co-cultivo con células de estroma (Lutzny y cols., 2013, Amigo-Jimenez y cols., 2015). La activación de SYK se produce tras la estimulación del BCR. Su inhibición tiene como consecuencia un aumento del porcentaje de células apoptóticas en cultivos en los que se había inducido la activación del BCR o en co-cultivos con NLCs o BMMSCs (Buchner y cols., 2010) mientras que *in vivo* reduce las adenopatías, probablemente induciendo una movilización de las LLC hacia el torrente sanguíneo (Friedberg y cols., 2010). Los inhibidores de la BTK, que forma parte de la misma ruta de señalización, por debajo de SYK, comprenden las últimas terapias desarrolladas para el tratamiento de la LLC en combinación con fármacos tradicionales y nuevos anticuerpos monoclonales (Vela y cols., 2016). Por último, debido a la elevada expresión de Bcl-2 en las LLC, se están desarrollando distintos inhibidores contra esta molécula. A pesar de los resultados *in vitro*, su eficacia en ensayos clínicos sigue siendo modesta (Campas y cols., 2006) (O'Brien y cols., 2009).

2.- LA FAMILIA DE RECEPTORES Y LIGANDOS TIROSIN-KINASA EPH/EPRIN

Los receptores Eph y los ligandos con los que interactúan preferentemente, ephrin, comprenden la familia de tirosin-quinasa más numerosa que se conoce. Estos receptores fueron identificados por primera vez en una línea hepática productora de eritropoyetina (Hirai y cols., 1987) y desde entonces se han descrito 16 receptores y 9 ligandos divididos en dos sub-clases A y B, en base a la afinidad por los correspondientes ligandos. Todos los receptores poseen una estructura homóloga, con un dominio extracelular y una porción citoplásmica. En la región extracelular encontramos el dominio de unión al ligando en el extremo amino-terminal, que determina la pertenencia a una de las dos sub-clases, seguido de una región rica en cisteínas y dos repeticiones fibronectina tipo III. La porción citoplásmica se encuentra unida por un dominio transmembrana y contiene el dominio tirosin-quinasa, un motivo SAM, lo que permite la interacción con otras proteínas, y un extremo con un dominio PDZ (Pasquale, 1997)(Figura 1). Una de las características distintivas de esta familia es el hecho de que los ligandos se encuentran unidos a la superficie celular de las células. Los ligandos ephrinA se encuentran anclados por un dominio GPI, mientras que los ephrinB constan de un dominio transmembrana y una región citoplásmica con un dominio src quinasa funcional y un motivo PDZ (Pasquale, 1997).

La formación de complejos receptor-ligando induce la fosforilación de los residuos de tirosina que desencadena rutas de señalización, sin embargo, también existe la posibilidad de que las señales sean independientes de la actividad quinasa (Matsuoka y cols., 2005). Existe una gran promiscuidad respecto a la interacción entre receptores y ligandos. De los receptores EphA, 9 pueden unir 5 de los ligandos ephrinA con afinidad variable, mientras que 5 receptores EphB interactúan con los 3 ligandos de la sub-familia B. De manera interesante, EphA4 es capaz de unir también ligandos B y EphB2 también reconoce ephrinA5. Por otro lado, EphB4 únicamente interactúa con ephrinB2 (Pasquale, 2005). La interacción entre los receptores y ligandos de

esta familia es muy particular en cuanto a que en muchas situaciones tanto Eph como ephrin pueden actuar como receptores y/o ligandos. La señal se denomina *reverse* si sucede en la célula que expresa el ligando y *forward* si se da en la célula que expresa el receptor (Pasquale, 2010) pudiendo llegar a desencadenarse cascadas de señalización bidireccional de manera simultánea. Es importante distinguir si los procesos afectados por la interacción Eph/ephrin se deben a un papel autónomo o no-autónomo de célula para poder intervenir correctamente en los mismos.

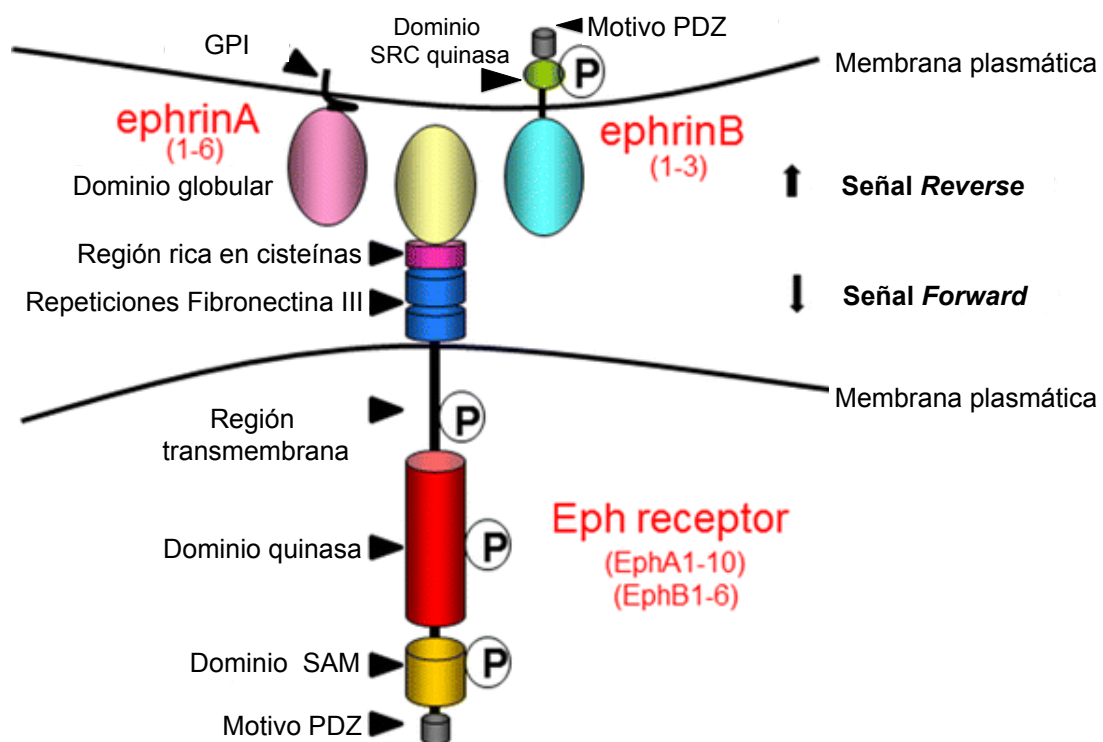


Figura 1. Esquema de la estructura de los receptores Eph y los ligandos ephrin. Los receptores de las sub-familias A y B presentan la misma estructura homóloga, con una porción extracelular en la que resalta un dominio globular de interacción con los ligandos, una región rica en cisteínas, seguida de varias repeticiones de fibronectina III; una región transmembrana conecta con la porción citoplásmica en la que se encuentra el dominio quinasa con sitios de fosforilación (P), un dominio SAM y finalmente una cola con un motivo PDZ. Los ligandos ephrinA se anclan a la membrana plasmática mediante un dominio que contiene una molécula GPI. Los ligandos ephrinB poseen una región transmembrana y a continuación un dominio src-quinasa y un último dominio con un motivo PDZ. La señalización inducida en la célula que expresa el ligando se denomina señal reverse, mientras que la señal forward se desencadena en la célula que porta el receptor. Modificado de (Nguyen y cols., 2016).

Dado el creciente número de estudios que muestran la expresión diferencial de los receptores Eph y los ligandos, ephrin, en las BMMSC y distintas poblaciones del linaje hematopoyético, implicados tanto en osteogénesis como en hematopoyesis, parece necesario profundizar en su estudio en la LLC (Anam y cols., 2013, Wang y cols., 2014, Nguyen y cols., 2015). El mecanismo de acción de estas moléculas implica interacciones célula-célula que pueden inducir adhesión o repulsión entre los distintos tipos celulares, por tanto esta familia es una candidata importante para regular la comunicación entre los tipos celulares presentes en el microambiente de médula ósea de la LLC. Los resultados previos de nuestro grupo habían puesto de manifiesto la importancia de su expresión en las LLC de sangre periférica (Alonso-Colmenar y cols., 2009) (Trinidad y cols., 2009). El análisis comparativo de la expresión en médula ósea y sangre periférica puede aportar información importante en relación con la clínica de la enfermedad. Teniendo en cuenta que Eph/ephrin pueden actuar tanto como supresores como promotores de la actividad tumoral en distintos tipos de cáncer (Pasquale, 2010), es fundamental caracterizar en profundidad su función en la LLC, en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas (Barquilla y cols., 2015).

Aunque gran número de miembros de esta familia han sido identificados en BMMSC y HSC, el tándem en el que se centran la mayoría de ellos es el formado por EphB4 y ephrinB2, las 2 presentes en ambos tipos celulares. La inducción de la señal forward a través de EphB4 en HSC, por la interacción con ephrinB2 expresada por BMMSC, potencia la diferenciación de las HSC hacia progenitores eritropoyéticos. De manera interesante, en esta situación la expresión de EphB4 disminuye tras el contacto con las células estromales, por lo que puede deducirse que la interacción induce la separación entre ambos tipos celulares, las HSC quedarían más expuestas a la unión de citoquinas que promoverían su diferenciación (Suenobu y cols., 2002). Por el contrario, la expresión de EphB4 en el estroma también es capaz de incrementar la expresión de ephrinB2 en células hematopoyéticas y su capacidad de migración (Okubo y cols., 2006). Así mismo, las BMMSC con una expresión incrementada de EphB4 ven aumentada su capacidad de sostener la viabilidad

de las células hematopoyéticas (Nguyen y cols., 2015). Estos ejemplos prueban la propiedad de la familia Eph/ephrin de generar distintas señales y en consecuencia distintos resultados funcionales, de forma contexto-dependiente, confirmando la necesidad de profundizar en el estudio de la función de estas moléculas en el microambiente de médula ósea.

3.- LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES DEL TNF EN LA LLC

Entre todas las moléculas relacionadas con la supervivencia de las células LLC en el microambiente mencionadas anteriormente, la superfamilia de receptores y ligandos del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) ha adquirido especial relevancia en los últimos años. Esta familia de moléculas desempeña su función durante el desarrollo y maduración normal de los linfocitos B. En concreto, el receptor del factor de activación de linfocitos B (BAFF-R), el antígeno de maduración de los linfocitos B (BCMA) y el activador transmembrana, modulador del calcio capaz de interaccionar con el ligando cyclophilina (TACI) tienen un papel crítico en la supervivencia de las células B en distintos estados de su desarrollo, mediante la interacción con BAFF y APRIL, el ligando capaz de inducir proliferación (Rickert y cols., 2011). Tanto BAFF como APRIL son capaces de unirse a BCMA, aunque su afinidad es mucho mayor por el segundo. BAFF-R sólo interacciona con BAFF con gran afinidad mientras que TACI puede unir ambos ligandos de forma similar (Bossen y cols., 2008). Por otro lado, APRIL también puede interaccionar con moléculas de proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs) que posiblemente contribuyen a su multimerización (Kimberley y cols., 2009). BAFF puede expresarse en membrana o secretarse al medio, tras su procesamiento proteolítico por una furin convertasa, como trímeros o en estructuras de mayor tamaño de hasta 60-mer (Liu y cols., 2002). APRIL es secretado en forma de trímeros después de su procesamiento a la salida del Golgi, aunque se han descrito isoformas producidas por *splicing* alternativo expresadas en la superficie celular (Lopez-Fraga y cols., 2001, Ingold y cols., 2005, Maia y cols., 2011). Mientras que BAFF-R es capaz de activarse por todas las formas de BAFF, TACI requiere las formas multiméricas o unida a membrana (Figura 2).

La transducción de la señal desencadenada por la interacción de los ligandos con BAFF-R, TACI o BCMA, implica la activación de NF- κ B (Endo y cols., 2007). La unión de BAFF a BAFF-R activa fundamental la ruta alternativa de NF- κ B, clave en el desarrollo normal de los linfocitos B que también puede inducirse por la pareja de moléculas CD40-CD40L, del mismo modo que la

señalización a través del BCR incrementa la expresión de BAFF-R (Cheema y cols., 2001, Smith y cols., 2003). Por el contrario, la unión de BAFF y APRIL a TACI y BCMA desencadena la vía canónica. De manera interesante, se ha descrito que esta última se encuentra activada de manera constitutiva en la LLC (Endo y cols., 2007).

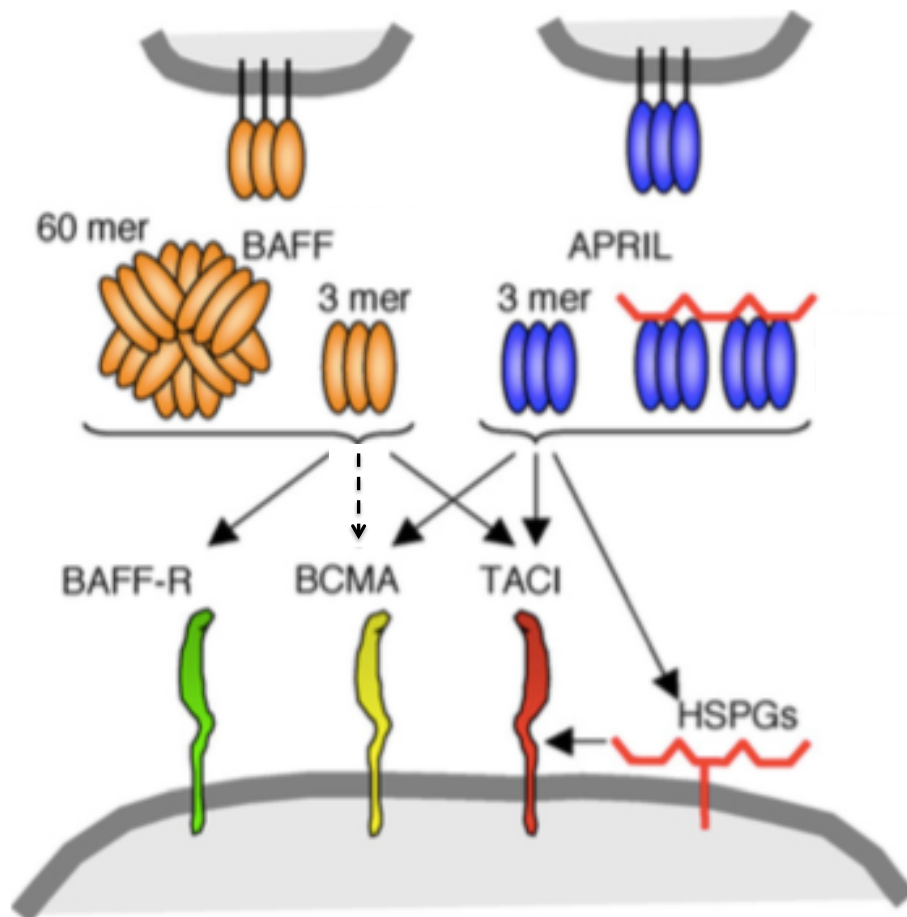


Figura 2. Esquema de la interacción entre receptores y ligandos de la super-familia del TNF. Los ligandos BAFF y APRIL se expresan tanto unidos a membrana como de forma soluble como trímeros (3 mer) o agrupaciones de estos (60 mer). BAFF puede unirse a los 3 receptores: BAFF-R, TACI y BCMA, aunque su afinidad por este último es menor. APRIL interacciona con TACI y BCMA y además con moléculas de proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs) (Modificado de Mackay y cols. (2008).

La desregulación de la interacción entre estas moléculas da lugar a procesos autoinmunes o linfoproliferativos. Pacientes de artritis reumatoide,

síndrome de Sjögren o lupus eritematoso sistémico presentan niveles elevados de BAFF en suero y líquido sinovial (Cheema y cols., 2001) y ratones en los que se sobre-expresaba este ligando desarrollaban síntomas concordantes con los de estas patologías (Mackay y cols., 1999). Dado que BAFF regula la supervivencia de las células B, el aumento de su expresión o de la actividad de sus receptores, también conduce al desarrollo de procesos linfoproliferativos descontrolados como linfomas no-Hodgkin (Batten y cols., 2004). En la LLC distintos estudios han mostrado la implicación de estas moléculas actuando tanto a través de mecanismos paracrinos (Nishio y cols., 2005) (El Shikh y cols., 2010) (Pontikoglou y cols., 2013) al ser producidas por NLCs, FDCs y BMMSCs, como de forma autocrina, expresados por las propias células leucémicas (Kern y cols., 2004).

Atendiendo a los resultados previos publicados por nuestro laboratorio, y a las distintas evidencias mostradas en la bibliografía, en el siguiente trabajo nos propusimos:

- ✓ Analizar las expresiones de Eph/ephrin en células LLC de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO), a fin de determinar cuál/es están relacionadas con su localización tisular y con distintos momentos de la enfermedad. Estudiar su relación con la evolución de la enfermedad, las características citogenéticas y parámetros moleculares de pronóstico (ZAP-70, CD38, estado mutacional genes IgVh) y la clínica de la enfermedad (estadios Rai/Binnet, patrón de infiltración medular, linfocitosis, adenopatías, etc).
- ✓ Caracterizar los tipos celulares que sustentan viabilidad de las LLC in vitro por su posible papel in vivo, su expresión de Eph/ephrin en relación con el de las LLC y si los mismos intervienen también en la resistencia a fármacos.
- ✓ Determinar cuál/es de las interacciones Eph/ephrin median en la resistencia a apoptosis o inducida por fármacos, de las células LLC.
- ✓ Determinar si las interacciones Eph/ephrin median en supervivencia/resistencia fármacos a través de otros mecanismos de creciente interés en la enfermedad, especialmente la familia BAFF/APRIL, la señalización vía integrinas y la estimulación a través del BCR y CD40.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PACIENTES

Todas las muestras empleadas en este estudio fueron proporcionadas por el Hospital Morales Meseguer de Murcia, respetando en todo momento el anonimato de los pacientes y previo consentimiento informado de los mismos. Se proporcionaron muestras extraídas de pacientes LLC de sangre periférica y aspirado de médula ósea del esternón o la cresta ilíaca, al diagnóstico o debido a progresión de la enfermedad. También dispusimos de fragmentos sobrantes de biopsias de médula en los casos en los que la situación del paciente requiriese realizar esta extracción para estudios anatomopatológicos.

2.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

2.1.- Aislamiento de las células leucémicas en sangre

En primer lugar procedíamos al enriquecimiento de la fracción leucocitaria en las muestras de sangre (aspirado de médula ósea o sangre periférica), por centrifugación en gradiente de densidad en medio Histopaque-1077 (*Sigma-Aldrich*) en (*Centrifuge 5810; Eppendorf* a 400 g; 30 minutos; 22°C). Recogíamos la fracción leucocitaria localizada en la interfase Histopaque-plasma resultante de la centrifugación. Diluíamos en PBS-EDTA-FBS y centrifugábamos dos veces a 1.100 revoluciones por minuto (rpm); 10 minutos, para lavar la suspensión celular antes de proceder al recuento en cámara de Neubauer (*BRAND GMBH + CO KG*).

Una vez determinado el número de leucocitos en nuestra suspensión inicial realizábamos un inmunofenotipo con anticuerpos monoclonales contra CD19 y CD5 unidos a fluorocromos (α CD19-FITC, *Immunostep* y α CD5-PECy5, *BD Biosciences*) para determinar el porcentaje de células LLC de la muestra (dobles positivas) por citometría de flujo. A continuación se procedían al aislamiento de las células leucémicas mediante un separador magnético automático (*AutoMACS, Magnetic-Activated Cell Sorting; Miltenyi Biotec*) siguiendo un protocolo de selección positiva. Las células, en una

concentración de 50×10^6 /mL, se incubaban durante 45 minutos, a 4°C, con un anticuerpo de ratón específico contra CD19 humano, unido a biotina (α CD19-biotina, Immunostep) añadiendo $0,5 \mu\text{g}/10^7$ células. Para minimizar las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo, se añadía a la mezcla un exceso de inmunoglobulinas de ratón (Jackson ImmunoResearch). Finalizada la incubación lavábamos dos veces con un exceso de PBS-EDTA-FBS (centrifugación, nueva resuspensión del pellet y centrifugación) con el fin de eliminar el anticuerpo no unido por las células. A continuación, incubábamos 15 minutos a 4°C, con partículas férricas con alta afinidad por la biotina (MACS- α Biotina, Miltenyi Biotec). Transcurrido ese tiempo, lavábamos nuevamente dos veces antes de resuspender las células a una concentración final de 50×10^7 células/mL o un volumen mínimo de 1 mL, siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión se introducía en el AutoMACS y seleccionábamos el programa POSSEL, cuando la muestra contenía más de un 80% de células CD19⁺, o POSSEL_S, si la población de interés era menor de un 80%. Tras el aislamiento, realizábamos el recuento de la fracción positiva para valorar el rendimiento del procedimiento y teñíamos una alícuota de esta suspensión con estreptoavidina conjugada con Alexa-Fluor[®] 488 (SAV-Alexa- Alexa-Fluor[®] 488; Molecular Probes, Life technologies) y α CD5-PECy5, para valorar la pureza de la población resultante. Si obteníamos más de un 99% de células LLC, éstas eran procesadas posteriormente para la extracción de ARN (ver más adelante).

2.2.- Procesamiento de biopsias de médula ósea

Empleamos fragmentos de cilindros de biopsias frescas de médula ósea tanto para estudios histológicos como para cultivos *in vitro* para caracterizar las poblaciones de estroma en el microambiente de médula y realizar ensayos funcionales.

- ✓ Estudio histológico: las porciones de biopsias de médula se embebían en medio de congelación específico para la criopreservación de tejidos (Tissue-TEK[®] O.C.T.[™] Compound (Sakura Finetek) y se congelaban cuidadosamente en nitrógeno líquido, donde eran almacenadas hasta su utilización.

- ✓ Suspensión celular: se disgregaba mecánicamente el cilindro en fragmentos pequeños con ayuda de un bisturí manteniéndolos en RPMI. Para obtener una suspensión unicelular se empleo una mezcla de enzimas (*Liberasa*) y *DNAasa* (*Roche*) disuelta en RPMI sin suero, para minimizar la cito-toxicidad generada por el procedimiento enzimático. Los fragmentos se incubaron en esta solución, previamente atemperada, durante 15 minutos a 37°C en el baño maría, resuspendiendo con el *Vortex* entre medias. Para neutralizar la acción de la liberasa añadíamos PBS-EDTA-10% FBS, manteniendo la suspensión sobre hielo, y resuspendíamos los fragmentos óseos con una pipeta *Pasteur* para liberar todas las células. Lavábamos la suspensión dos veces en PBS-EDTA-10%FBS y dividíamos las células para su análisis por citometría de flujo (caracterización de la población mesenquimal en las biopsias frescas) y para sembrar cultivos (ver cultivos celulares).

3.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE Eph/ephrin MEDIANTE RT-qPCR

3.1.- Aislamiento de ARN

La extracción de ARN total se realizaba tras el aislamiento de la población leucémica descrito en el apartado 2.1. Las suspensiones celulares se lisaron en Tri-Reagent (*Sigma-Aldrich*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se procedió a la separación del ARN de las proteínas y ADN mediante la centrifugación con 1-Bromo-3-Cloropropano. Tras recuperar la fase acuosa conteniendo el ARN, se congelaba la fase fenólica y la interfase para su uso en futuros experimentos y continuamos la extracción siguiendo un método de separación en columnas (*RNeasy MinElute Kit, Qiagen*). La cantidad y calidad del ARN extraído se valoraban mediante lectura de absorbancias en el Nanodrop y BioAnalyzer considerando un valor óptimo de calidad de ARN el ratio A_{260}/A_{280} de 1,8 a 2 y tomando 1 µg de ARN para la reacción de transcripción inversa. Tanto las valoraciones de cantidad y calidad como la obtención de los ADNc y las PCR cuantitativas (Q-RT-PCR) se

realizaron en la Unidad de Genómica del C.A.I Genómica y Proteómica de la UCM.

3.2.- PCR cuantitativa

Para realizar las Q-RT-PCR se utilizaron las tarjetas microfluídicas personalizadas para nuestros genes de interés (*Taqman Low Density Array*, *Applied Biosystems*) utilizando como calibradores Actina y GAPDH. La cuantificación relativa de cada moléculas, se realizó por el métodos de 2-DDCt. Linfocitos B o BMSC de donantes sanos se emplearon como población calibradora en cada caso.

4.- ENSAYOS *IN VITRO*. CULTIVOS CELULARES

4.1.- Cultivos de células de estroma de médula ósea de pacientes LLC y de donantes sanos

Las suspensiones de células LLC procedentes de aspirados de médula (y de biopsias frescas digeridas con liberasa cuando era posible) se cultivaban en medio RPMI-Completo (Anexo) en condiciones estándar (Incubador: 37°C, 5% CO₂, humedad) a una concentración de 4x10⁶ células/mL (aprox 10⁶ células/cm²). Después de 2-3 semanas de cultivo las células alcanzaban la confluencia deseada. Retirábamos la fracción celular no adherente mediante suaves lavados con medio de cultivo y recuperábamos las células adheridas lavando con PBS-EDTA 5mM e incubando después de 15-30 minutos con PBS-EDTA 10mM a 37°C (todas las soluciones previamente atemperadas). Seguidamente se procesaban de acuerdo al experimento correspondiente (FACS, co-cultivos, extracción de ARN...) o bien se desdoblaban para su utilización en futuros experimentos.

Se proporcionaron suspensiones celulares crio-preservadas en FBS-DMSO, derivadas de aspirados de médula de donantes (BMMSC sanas). Se cultivaron en RPMI-completo, renovando el medio cuando fuera necesario, hasta alcanzar la densidad adecuada y se procesaron del mismo modo que las

BMMSC de pacientes LLC para los distintos experimentos.

4.2.- Cultivos de las líneas de estroma de médula ósea Hs5 y Hs27

Las líneas celulares Hs5 y Hs27, fueron adquiridas en ATCC®. Son células de estroma de médula inmortalizadas con los genes E6/E7 del virus del papiloma humano (*Roecklein and Rorok-Storb*, 1995). Comparten muchas características con el estroma primario y son utilizadas en muchos trabajos para analizar la capacidad protectora del microambiente. LA Hs5 tiene morfología fibroblástica, secreta gran cantidad de factores solubles y es la única con capacidad para sostener la proliferación de progenitores hematopoyéticos co-cultivados, en ausencia de suero u otros factores exógenos. Sin embargo, la Hs27 se corresponde con células mucho más grandes, tipo epitelial, secreta niveles bajos de factores de crecimiento y no promueve la proliferación de progenitores, sin embargo, posee gran potencialidad para las uniones intercelulares. Ambas se seleccionaron por representar componentes diferenciales del microambiente de médula ósea.

Las líneas se cultivaron en RPMI-completo en condiciones estándar, siendo desdobladas con PBS-EDTA, hasta un máximo de 8 pases para la utilización en experimentos.

4.3.- Cultivos de células LLC. Ensayos funcionales

En todos los ensayos (a excepción de los realizados con fármacos citostáticos), se empleo como medio de cultivo RPMI-experimental, con FBS al 2% (ver Anexo) con el objeto de mantener las células en condiciones restrictivas y poder analizar el efecto de los distintos estímulos añadidos o del co-cultivo sobre la supervivencia.

La evaluación de los ensayos por citometría de flujo se realizó en un FACS_{CALIBUR} y se analizaron posteriormente con el programa *FCS Express V4*.

4.3.1.- Ensayos con proteínas recombinantes Eph/Ephrin-Fc

Las proteínas recombinantes utilizadas (*R&D Systems*) consistían

en homodímeros del dominio extracelular de interacción ligando-receptor, un péptido de unión (IEGRMD) y una región del fragmento Fc de IgG humana, que a su vez está fusionado con seis repeticiones de Histidina (Hist). Todos los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos y las células LLC se sembraron a una densidad de 2×10^5 LLC/pocillo.

Con el objeto de activar la señalización a través del receptor o del ligando correspondiente, las células se sembraron sobre EphB4/ephrinB2-Fc (0,5µg/mL) inmovilizadas sobre la superficie de cultivo, o sobre fragmentos Fc de IgG humana (h-Fc, *Jackson ImmunoResearch*). Para esto, los pocillos de placas de cultivo se pre-incubaron con 100µL de PBS con la concentración deseada de proteína, durante 1 hora a 22°C. Transcurrido ese tiempo los pocillos eran lavados con PBS para posteriormente añadir las células.

Para tratar de bloquear las interacciones entre las células LLC a través de EphB4 y ephrinB2, las proteínas recombinantes se añadieron en forma soluble (1µg/mL) manteniéndose en el medio de cultivo durante toda la duración del experimento. En estos ensayos, antes de añadir estas proteínas, pre-incubabamos las células LLC con fragmentos Fc de IgG humana (h-Fc, *Jackson ImmunoResearch*), a una concentración de 0,5µg/ 10^6 células, durante 10 minutos a 4°C, con el fin de bloquear la unión de las proteínas recombinantes a las células por su dominio Fc.

En el caso de los co-cultivos células LLC-BMMSC, cada tipo celular se pre-incubo con EphB4-Fc o ephrinB2-Fc (1µg/mL) respectivamente durante 15 minutos a 37°C. Las células se lavaron con un exceso de medio de cultivo antes del inicio del experimento.

4.3.2.- Cultivos de células LLC con distintos estímulos

Las células LLC se cultivaron durante 3 días junto con diferentes estímulos críticos en el microambiente, para posteriormente analizar los cambios en viabilidad y las modulaciones en la expresión de otras

moléculas.

En los casos indicados, las células se cultivaron sobre componentes de la matriz extracelular como Fibronectina (10µg/mL, Sigma-Aldrich), sobre los ligandos de integrinas ICAM-1 o VCAM-1 (10µg/mL R&D Systems) o bien sobre de αIgM (0,5 µg/mL; Fragmentos F(ab)₂, Jackson ImmunoResearch Europe) inmovilizados en placa. Así mismo, el medio de cultivo se enriqueció con TNF-α a 10 ng/mL (PeproTech); las quimiocinas rhBAFF y rhAPRIL solubles a 0,2 µg/mL (PeproTech) y SDF-1α (0,1µg/mL) (Peprotech). También se emplearon homodímeros de CD40L (R&D), que se añadía en forma pre-agregada, aprovechando la presencia de una cola de Hist, con α-poli-Histidina-b (R&D Systems). Las moléculas se incubaban en cantidades equimolares (0,1 µg/mL de CD40L + 1 µg/mL de α-Hist) en frío antes de añadirlas al cultivo.

4.3.3.- Ensayos de bloqueo de la señalización mediada por moléculas de la familia BAFF

En los casos indicados, se añadieron a los cultivos formas recombinantes de los receptores rhBAFF-R y rhTACI a una concentración de 0,5µg/mL (Peprotech) y anticuerpos αBAFF y αAPRIL (0,5µg/mL, Abcam), con el objeto de secuestrar los ligandos secretados al medio de cultivo impidiendo la unión con el receptor correspondiente expresado en la membrana de los linfocitos LLC.

4.3.4.- Co-cultivos estroma-LLC. Ensayos de supervivencia

Para estos ensayos, aislamos la población de BMMSC CD45⁻ a partir de los cultivos de células adherentes totales obtenidos de los aspirados o biopsias de médula ósea. Para deplecionar la suspensión celular de células CD45⁺, las incubamos con αhCD45-biotina hecho en ratón (Immunostep) y posteriormente, con bolas magnéticas anti-biotina (Microbeads, Miltenyi) para su separación en AutoMACS utilizando el programa DEplete o de forma manual empleando Dynabeads[®] Pan

Mouse IgG, en función de la cantidad de células de estroma obtenidas en el cultivo inicial

Las células de estroma primario se sembraban en placas de 96 pocillos de fondo plano a la densidad necesaria para que la proporción de BMMSC/ linfocitos LLC fuera 1/10 al inicio del co-cultivo y las BMMSC no alcanzasen la confluencia. La expansión del estroma se realizó en ausencia de células LLC, en RPMI-completo durante 2-3 días para que el cultivo se estableciese adecuadamente antes de añadir las células LLC.

El ritmo de crecimiento del estroma primario es muy lento, sin embargo, las líneas Hs5 y Hs27 dividen rápidamente agotando el medio de cultivo, por lo que es necesario parar su crecimiento antes de añadir las LLC. Para ello, sembrábamos la placa de 96 y a las 24 horas, una vez que se hubiesen adherido firmemente al plástico, las incubábamos con Mitomicina C (*Sigma Aldrich*) a 5 µg/mL en RPMI-completo, 2h a 37°C en incubador. Transcurrido ese tiempo se lavaban los pocillos suavemente con RPMI-completo atemperado y dejábamos reposar el cultivo 4 horas antes de comenzar el ensayo.

En los casos correspondientes, los estromas se trataron con RPMI-experimental con TNF-α (10 ng/mL) durante toda la noche, siendo reemplazado por medio fresco al menos dos horas antes del co-cultivo.

Los co-cultivos de estroma y linfocitos leucémicos se establecieron durante 72 horas en RPMI-experimental. En algunos supuestos, se añadía a los co-cultivos las proteínas recombinantes Eph/Ephrin-Fc en forma soluble como se indicaba en el apartado 4.3.1.

Para el análisis de la viabilidad por citometría de flujo, los pocillos de cultivo se levantaban con PBS-EDTA atemperado con el fin de recuperar todas las células. Las suspensiones celulares se incubaban durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución tampón HEPES especial para la tinción con Anexina-V que contenía Anexina-V-

PE (0,6 μ L/pocillo; *Immunostep*) y α CD19-FITC (3 μ L/pocillo; *Immunostep*) para poder acotar la población LLC. Pasados los 30 minutos se lavaban en Tampón de Anexina y se añadía el colorante fluorescente intercalante de ADN 7-AAD a una concentración de 1 μ g/mL (*Sigma Aldrich*) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las suspensiones se llevaban al volumen deseado y se mantenían en frío para su análisis en el citómetro. El porcentaje de células CD19⁺ vivas se determinó como la población doble negativa para Anexina-V y 7AAD.

4.3.5.- Co-cultivos en placas Transwell

En los supuestos indicados, llevamos a cabo el co-cultivo de las células LLC y el estroma separando ambos tipos celulares por un filtro para discriminar el papel de los contactos intercelulares y de los factores solubles en la supervivencia. Para ello se emplearon placas *Transwell Insert Plates* (*Costar, Corning*) con formato de 96 pocillos y filtros con tamaño de poro de 5 μ m de diámetro. Las BMMSC se sembraron en el pocillo inferior o sobre el filtro en función del ensayo. No se necesitó añadir ninguna matriz extracelular a la superficie de cultivo. La proporción estroma/linfocito se mantuvo igual que en los demás ensayos de co-cultivo.

4.3.6.- Ensayos de supervivencia frente a fármacos citostáticos

Para analizar la resistencia de las células LLC frente a la apoptosis inducida por fármacos, empleamos algunas de las drogas citostáticas más empleadas para el tratamiento de esta patología. Fludarabina (1 μ M), Mafosfamida (5 μ M), Bendamustina (15 μ M) (*Santa Cruz Biotechnology*) y Chlorambucil (25 μ M) (*Sigma Aldrich*) se añadieron a los cultivos de células LLC solas o en co-cultivo con BMMSC durante 72h hasta el análisis de la viabilidad en el citómetro de flujo. La concentración empleada se determinó en experimentos previos del laboratorio, de manera que se conseguía un descenso de hasta el

50% en la supervivencia.

4.3.7.- Ensayos de adhesión linfocito-estroma. Análisis de conjugados

Los cultivos de estroma se levantaron con PBS-EDTA a temperatura a 37°C. Las suspensiones celulares se teñían con el colorante fluorescente Oregon Green® (*Molecular Probes, Invitrogen*) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La fluorescencia emitida se recogía en el canal FL-1H del FACS_{CALIBUR}. A su vez, los linfocitos LLC eran teñidos con el colorante SNARF-1® (*Molecular Probes, Invitrogen*) de forma que identificábamos su fluorescencia en los canales FL-2H y FL-4H del citómetro de flujo.

Una vez teñidos, ambos tipos celulares se mezclaban para co-cultivarlos en una proporción de 200×10^3 linfocitos y 20×10^3 BMMSC por pocillo en un volumen de medio de 30 μ L de medio durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo añadíamos 30 μ L de medio de forma que los agregados se recuperaban suavemente para no deshacer los complejos linfocito-estroma y poder analizarlos por citometría de flujo. Acotábamos nuestra población de interés en un *dot-plot* en el que representábamos el tamaño frente a la complejidad y analizábamos en ella los canales de fluorescencia correspondientes. El porcentaje de conjugados se determinaba como el porcentaje de células doble positivas en FL-1H y FL-4H.

En los casos correspondientes, antes de juntar los dos tipos celulares para que se formasen los conjugados, se incubaron de forma separada, con las proteínas recombinantes EphB4-Fc y ephrinB2-Fc (1 μ g/mL). Tras la incubación, lavamos las células para descartar el exceso de proteína.

En ocasiones, se procedió a la formación de estos conjugados linfocito-estroma para su análisis por microscopía confocal. En estos casos, ni las células de estroma ni los linfocitos se teñieron con colorantes fluorescentes previamente al co-cultivo para poder llevar a cabo la inmunodetección de las moléculas de interés con anticuerpos

conjugados a fluorocromos. Tras el co-cultivo durante 12 horas, se recuperaban los conjugados de la forma previamente descrita y tras fijarlos con *CellFix*, las incubaciones se realizaron en suspensión empleando tubos de 1,5 mL *Eppendorf*. Finalmente, se resuspendían los complejos en un volumen pequeño de medio de montaje para fluorescencia (*Pro Long[®] Gold*, *Life technologies*) y se montaban sobre el portaobjetos con cubreobjetos de vidrio de 0,14 mm de espesor (*Menzel-Gläser*).

4.3.8.- Cultivos de HUVEC

Las células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC, *PromoCell*), se cultivaron en medio de cultivo comercial (Endothelial Cell Growth Medium, *PromoCell*), renovándolo cada 3 días hasta su utilización en los experimentos, siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el desdoblamiento de los cultivos en su expansión y utilización en experimentos funcionales, se realizaba un lavado con PBS-EDTA, seguido de la incubación con Tripsina diluida en PBS-EDTA (1:4) durante aproximadamente 1 minuto, previa observación en el microscopio. La tripsina se neutralizaba con un volumen equivalente de RPMI-completo. Todas las soluciones se atemperaron previamente a 37°C. El número máximo de pases realizados en estas células para su utilización fue de 8.

Para los co-cultivos con células LLC, las HUVEC eran sembradas en placas de 96 pocillos hasta alcanzar la confluencia. En las situaciones indicadas se incubaron con TNF- α (10 ng/mL) durante toda la noche, siendo retirado el estímulo al menos 2 horas antes del inicio del co-cultivo y reemplazado por RPMI-experimental. En los casos necesarios, las monocapas de HUVEC se fijaron con una solución comercial de paraformaldehído al 4% (*Cellfix*, BD) durante 15 minutos en condiciones estándar en el incubador. Transcurrido ese tiempo, se retiraba el fijador, lavando abundantemente con PBS 1x y añadiendo finalmente RPMI-experimental.

5.- SILENCIAMIENTO EphB4/EphrinB2 CON siRNA

5.1.- Transfección BMSCL con siRNA para EphB4

En las líneas de estroma Hs5 y Hs27a, empleamos el reactivo de transfección *HiPerfect* (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para silenciar EphB4, utilizamos una mezcla específica de dúplex pre-diseñados (MISSION[®] esiRNA, Sigma Aldrich) a una concentración 100 nM en el volumen final de cultivo. Como control negativo se emplearon siRNA aleatorios (100nM, Qiagen) mientras que como control positivo de la transfección empleamos siRNA modificados con Alexa-Fluor[®] 488 (Qiagen). Las células se sembraban en la placa el mismo día de la transfección en RPMI-completo aproximadamente a un 60% de confluencia. Se cultivaban durante 1 hora y se añadían los complejos siRNA más *HiPerfect*, pre-incubados a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos, en medio de cultivo sin suero ni antibióticos. A 12 horas de la transfección se re-emplazaba el medio de transfección por medio fresco para minimizar la toxicidad. Transcurridas 24 horas, desde la adición de los complejos siRNA-*HiPerfect*, se añadía el tratamiento con Mitomicina C para detener la división celular. Dejábamos reposar el cultivo antes de levantar las líneas y comprobar la caída de la expresión de EphB4 a nivel de proteína por citometría de flujo durante varios días.

5.2.- Nucleofección células LLC con siRNA para EphrinB2

Para poder silenciar EphrinB2 en los linfocitos leucémicos empleamos la tecnología Amaxa Nucleofection (Lonza). Se utilizaron los MISSION[®] esiRNA de Sigma Aldrich a una concentración de 600 nM en el volumen de reacción. Un máximo de 10^7 células LLC se nucleofectaron en cada reacción siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El programa utilizado fue el E0-117 para células B humanas. Los linfocitos transfectados se cultivaron en RPMI-completo y se comprobó el silenciamiento de EphrinB2 hasta 7 días después de la transfección. Los siRNA utilizados como control positivo y negativo fueron los mismos que para la transfección de las BMSCL.

6.- ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las tinciones con anticuerpos se realizaron en tampón PBS-FACS, utilizando en cada marcaje de 2 ó 3 x 10⁵ células LLC en 50 µL de PBS-FACS. Los lavados se realizaron añadiendo un exceso de la solución tampón y centrifugando las muestras durante 5 minutos a 1.100 rpm en una centrífuga (MULTIFUGE 3 s-r, Heraeus).

En las tinciones se emplearon cantidades saturantes de anticuerpo, recomendadas por los fabricantes o previamente evaluadas en nuestro laboratorio. Se utilizaron anticuerpos conjugados a fluorocromos para el caso de las tinciones directas, o bien anticuerpos primarios purificados, no conjugados o modificados con biotina en las tinciones indirectas. En estos últimos casos, tras la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, la detección se llevaba a cabo incubando con anticuerpos secundarios especie-específicos ya conjugados a fluorocromos o SAV unida a fluorocromo. En los supuestos en los que la tinción incluía tanto marcaje directo como indirecto en la misma muestra, siempre se realizaba en primer lugar el indirecto. Así mismo, para la detección de proteínas intracelulares, en los casos en que el anticuerpo reconocía un dominio intracelular de una proteína de membrana, se requería un paso previo de permeabilización. En primer lugar, se realizaban las tinciones en la superficie celular de la forma ya descrita y, a continuación, las muestras se fijaban añadiendo la solución comercial que contenía paraformaldehído al 4% (*Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences*) a la vez que se mezclaban en el vortex, manteniéndola durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente, las células se lavaban con un tampón comercial conteniendo saponina como agente permeabilizante (*PermWash, BD Biosciences*) que a su vez se mantenía durante todo el tiempo de incubación con los anticuerpos contra las proteínas intracelulares. Finalmente, las células eran resuspendidas en tampón PBS-FACS para su análisis en el citómetro.

Los anticuerpos empleados para la caracterización inmunofenotípica de las células LLC y de los estromas primarios se encuentran recogidos en el ANEXO 1.

La adquisición de muestras se realizó en un citómetro de flujo FACS_{CALIBUR} (*Fluorescence-Activated Cell Sorting; BD Immunocytometry systems*), equipado con dos láseres de 488 nm y 630 nm y cuatro detectores de fluorescencia, o un FACS_{SCAN} (*BD Immunocytometry systems*) equipado con un láser de 488 nm y 3 detectores de fluorescencia, ambos del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM. La adquisición de muestras y el análisis de datos mediante citometría de flujo se realizó con los programas *CellQuest* o *CellQuest-Pro* (*BD Immunocytometry systems*) y FCS Express V4.

7.- MICROSCOPIA CONFOCAL

7.1.- Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas en un microscopio confocal espectral (TCS-SP2 AOBS, Leica) acoplado a un microscopio monitorizado invertido (IRE-2, Leica). La adquisición del escaneo secuencia fue llevada a cabo por *line-averaging* (x8) y acumulada por *frame* (x2) a una resolución de 1024 x 1024 píxeles, en una habitación a 22°C en oscuridad. Los programas informáticos utilizados para tratamiento y análisis de imágenes fueron: Leica Confocal Software LCS (Leica Microsystem Corp.) e Image-J.

7.2.- Inmunofluorescencia en biopsias de médula ósea

Los fragmentos de cilindros de médula ósea almacenados en N₂ líquido se procesaron en el criostato (Leica 1850) a -24°C, obteniéndose secciones longitudinales de 10 µm de grosor. Las secciones se dejaban secar al aire toda la noche antes de congelarlas, sin fijación previa, a -80°C. Para la realización de las inmunofluorescencias, se descongelaban y se dejaban secar antes de fijarlas con acetona (*Panreac*) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se dejaba secar la acetona durante un mínimo de 2 horas y a continuación se prehidrataban las secciones en PBS-BSA. Las incubaciones con anticuerpos se realizaban en cámara húmeda añadiendo a cada sección 50 µL de solución PBS-BSA con 0,2 µg del anticuerpo correspondiente. Entre cada incubación se realizaban 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBS-BSA. Al terminar las

incubaciones con anticuerpos se fijaban la preparaciones con la solución comercial *Cytofix* (BD Biosciences). Finalmente se realizaba una contra-tinción de los núcleos con *Hoechst 33342* (Life Technologies) y se montaban en medio *Pro Long*[®] Gold con cubreobjetos de vidrio de 0,14 mm de espesor.

Las secciones de tejido se incuban primero con anticuerpos primarios α EphB4 (hecho en conejo; Santa Cruz Biotechnology), α EphrinB2-biotinado (R&D Systems), Ki-67 (hecho en ratón; BD Biosciences), STRO-1 (hecho en ratón; BD Biosciences), que se revelaban con el correspondiente anticuerpo secundario especie-específico o SAV unidos a fluorocromos.

8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron en triplicados para cada una de las muestras analizadas. Las pruebas estadísticas realizadas se describen en cada uno de los apartados. La significancia estadística de los experimentos se valoró mediante el estadístico *T-Student*, para muestras pareadas o no pareadas, con una o dos colas de distribución de forma correspondiente. Se realizaron análisis de regresión simple para determinar la correlación entre variables continuas. Para comprobar la significancia estadística de variables en los que no se puede asumir una distribución normal, utilizamos la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Tanto para el análisis de los resultados como para la representación gráfica de los mismos se utilizaron los programas informáticos *StatGraphics Centurion XVI* o *Microsoft Office Excel*. Las diferencias estadísticamente significativas se representan en base a los siguientes valores: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$.

RESULTADOS

1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE Eph/Ephrin EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES DE LLC Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN TISULAR, FACTORES PRONÓSTICO Y LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

1.1.- Análisis mediante qPCR de la expresión de Eph/ephrin en células LLC obtenidas de sangre periférica y médula ósea de los pacientes

Los resultados previos de nuestro grupo habían mostrado la presencia de distintos miembros de la familia de tirosin-quinasas Eph/ephrin en la sangre periférica de pacientes LLC, destacando la elevada expresión de ephrinA4 en todos los pacientes y su papel en la migración transendotelial (Alonso-Colmenar y cols., 2009, Trinidad y cols., 2009) Así mismo, dichos estudios habían mostrado la expresión diferencial de estas moléculas en distintos tejidos linfoides comparando muestras de adenopatías y sangre periférica. Por otro lado, diversos autores han puesto de manifiesto el papel de Eph/ephrin en el desarrollo de la médula ósea en condiciones tanto sanas como patológicas. Por todo ello, al comienzo de nuestro estudio nos propusimos analizar la expresión de esta familia de moléculas de forma comparativa en muestras de células LLC procedentes de sangre periférica y aspirados de médula ósea del mismo paciente.

En una primera aproximación decimos analizar la expresión de la familia Eph/ephrin mediante qRT-PCR en muestras pareadas de 84 pacientes. Para ello, ARNm total fue aislado de la población de células leucémicas enriquecida al menos en un 98%, mediante selección positiva de la población CD19⁺ CD5⁺ en AUTOMACS. Los transcritos resultantes se analizaron en tarjetas microfluídicas TLDA (Applied Biosystems) diseñadas con cebadores específicos para identificar todas las isoformas descritas de cada una de las moléculas de interés (Anexo). La cuantificación relativa de cada molécula se llevó a cabo mediante el método de 2-DDCt utilizando como muestras

calibradoras mRNA obtenidos de células B aisladas de donantes sanos. Nuestro primer objetivo consistió en valorar las diferencias de expresión de las distintas moléculas debidas a su diferente localización tisular. Dado que la expresión de ZAP70, de acuerdo con trabajos anteriores, no se veía modificada entre ambos compartimentos celulares, la incluimos en nuestros análisis de forma que las variaciones en la expresión de cada una de nuestras moléculas de interés se compararon con la de este gen. En la figura 3 se muestra mediante diagramas de cajas y bigotes la cuantificación total de los mensajeros para cada molécula en todos los pacientes.

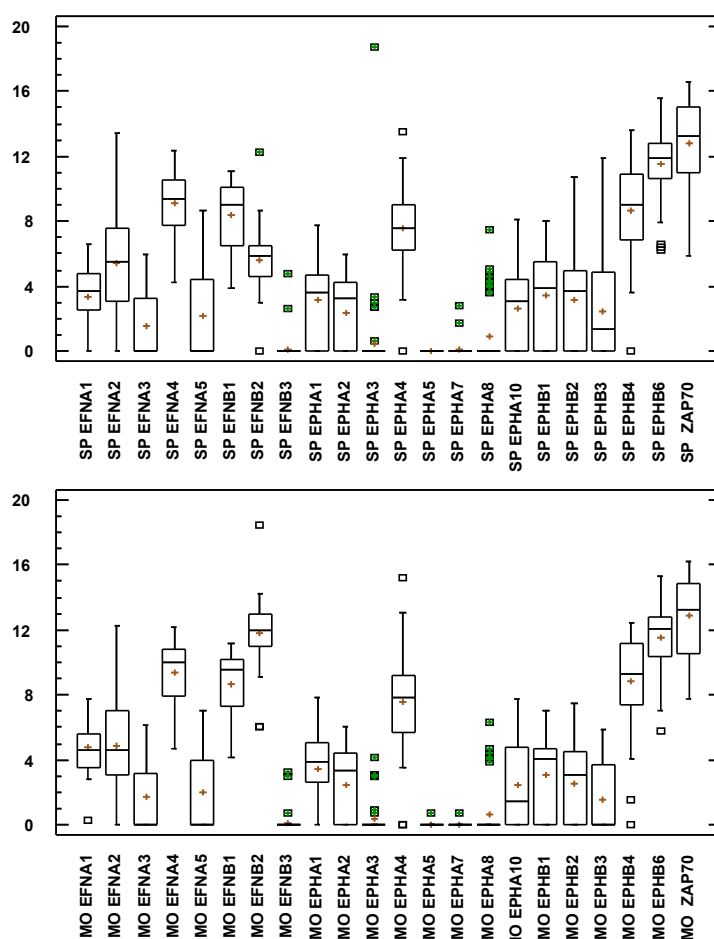


Figura 3. Análisis de la expresión de Eph/EFN por qRT-PCR en células LLC de SP y MO. Los diagramas de cajas y bigotes muestran la expresión a nivel de ARNm de la familia Eph/EFN y ZAP70 en ambos compartimentos celulares (SP gráfico superior y MO gráfico inferior) de todos los paciente incluidos en nuestro estudio.

1.2.- Confirmación de los resultados obtenidos por qPCR, a nivel de proteína mediante análisis por citometría de flujo

A tenor de los resultados anteriores quisimos comprobar si los niveles de expresión observados al cuantificar los mensajeros se mantenían a nivel de proteína. Los anticuerpos comerciales disponibles para la detección de Eph/ephrin en la superficie celular siguen siendo escasos, sin embargo, la expresión de la mayoría de las moléculas incluidas en nuestro análisis de qPCR fue valorada por citometría de flujo en un elevado número de nuestra cohorte de pacientes. Se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en cabra unidos a biotina para detectar la expresión de los ligandos ephrinB1, ephrinB2 y ephrinA4 revelando posteriormente con SAV-AlexaFluor488[®], mientras que para la detección de los receptores las células se incubaron primero con anticuerpos policlonales hechos en cabra o conejo y a continuación con los anti-sueros correspondientes conjugados a AlexaFluor488[®]. La expresión de EphB4 se confirmó mediante un anticuerpo monoclonal hecho en rata conjugado a PE, mientras que para poder valorar la expresión de EphA4 empleamos un policlonal conjugado a PE que detectaba un epítipo dentro del dominio intracitoplásmico de la proteína. El análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para las distintas moléculas confirmó los resultados obtenidos mediante qPCR, observándose una correlación positiva entre la cuantificación a nivel de mensajero y a nivel proteico de todas las moléculas de las que habíamos detectado una presencia significativa en médula ósea (*Figura 5*).

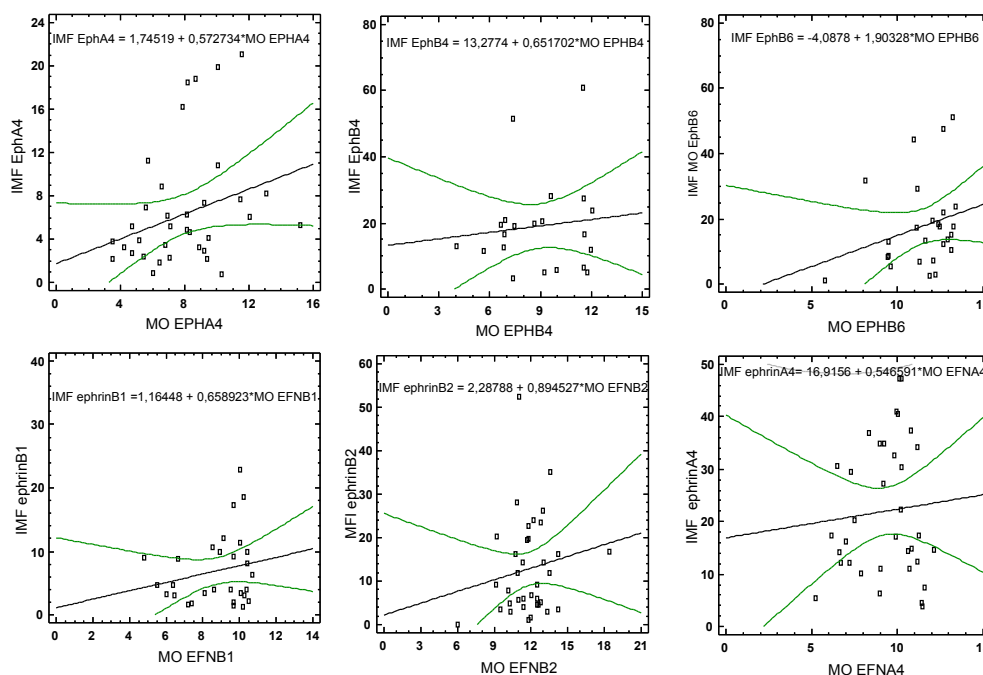


Figura 5. Los valores de expresión a nivel de mRNA de las moléculas con un nivel más elevado en MO se correlacionan positivamente con la expresión de las mismas a nivel de proteína. Análisis de correlación de la expresión de EphA4, EphB4, EphB6, ephrinB1, ephrinB2 y ephrinA4 validadas por qPCR (eje horizontal) y citometría de flujo (eje vertical) en pacientes LLC. Dentro de cada gráfico se muestra la ecuación de la recta de correlación.

De forma relevante, el análisis de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo no solo confirmó la sobre-expresión de ephrinB2 en las células LLC de médula ósea, sino que mostró la existencia de un perfil bimodal para esta molécula en las células de este compartimento, ausente en aquellas extraídas en sangre periférica. Identificamos una baja proporción de células con una expresión muy elevada, pero constante entre las muestras, de ephrinB2 que denominamos $ephrinB2^{high}$ para distinguirla de la población mayoritaria con una expresión intermedia ($ephrinB2^{int}$) (Figura 6). Este resultado nos llevó a preguntarnos si esta sub-población pudiese estar relacionada con los elevados valores detectados por qPCR para esta molécula en médula ósea pero no en sangre periférica. Por ello, analizamos la posible correlación de los valores DDCT con el porcentaje de células $ephrinB2^{high}$, así

como con los valores de intensidad de fluorescencia media de la población mayoritaria, confirmando que la elevada expresión de ephrinB2 a nivel de mRNA se correlacionaba positivamente con la expresión de esta proteína en la población mayoritaria ephrinB2^{int}.

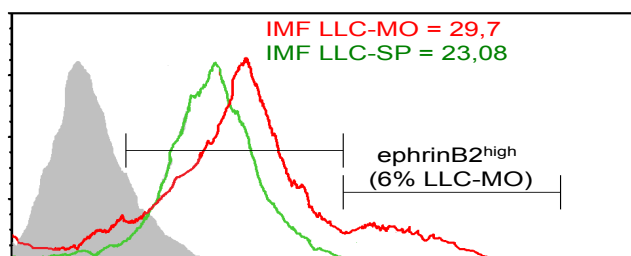


Figura 6. Análisis por citometría de flujo de la expresión de ephrinB2 en LLC-SP y LLC-MO. Perfil representativo de la expresión de ephrinB2 en células de SP (verde) y MO (rojo). Indicamos la IMF de la población mayoritaria y el % de LLC-MO con una expresión ephrinB2^{high}.

1.3.- Análisis de la expresión de Eph/ephrin en médula ósea en relación con las características clínicas de los pacientes

Nuestros resultados habían mostrado una gran variabilidad en la expresión de distintos miembros de la familia Eph/ephrin en los pacientes LLC. A continuación nos preguntamos si, dada la heterogeneidad de esta enfermedad, dichas variaciones pudiesen estar asociadas con distintos parámetros clínicos, características citogenéticas o factores pronóstico.

A pesar de los avances de los últimos años, aún no existen factores que permitan discriminar al diagnóstico aquellos pacientes que puedan evolucionar drásticamente durante el transcurso de la LLC. Entre los factores considerados tradicionalmente, el sistema de estadios de Rai modificado sigue siendo el más utilizado. Decidimos analizar la expresión de nuestras moléculas de interés en los pacientes catalogados según los estadios de riesgo bajo, intermedio o alto respectivamente. Como puede verse en la figura 7, el análisis de los datos de expresión aplicando la prueba de Kruskal-Wallis, mostró que los valores de IMF de los ligandos ephrinB1 y ephrinB2 se encontraban claramente incrementados

en los pacientes en estadio intermedio o alto en comparación con los de riesgo bajo, mientras que ephrinA4 se expresaba con mayor intensidad en los pacientes con mejor pronóstico. En el caso de los receptores EphB4 y EphB6, su IMF era significativamente más alta en los pacientes en estadio avanzado, mientras que el análisis estadístico no mostró diferencias en los valores de EphB2 y EphA4 entre los tres grupos establecidos.

Dentro de los marcadores biológicos que han mostrado una mayor relevancia en la clínica se encuentra el análisis de mutaciones en la región variable del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGHV), cuyo resultado suele ir correlacionado con el de la expresión de ZAP70 como marcador subrogado, teniendo peor pronóstico aquellos pacientes IGHV-no mutadas y/o ZAP70⁺ frente a los IGHV-mutadas y/o ZAP70⁻. Evaluamos si existía una distribución de nuestras muestras entre estos dos grupos en relación con su expresión de distintos miembros de la familia Eph/ephrin. Nuestros resultados indicaron que, de forma significativa, existían una mayor expresión de los ligandos ephrinB1 y ephrinB2 en los pacientes con IGHV-no mutadas y en los ZAP70⁺, así como también encontramos que la elevada expresión de EphB4 asociaba con positividad para ZAP70 pero no con el estado mutacional de las inmunoglobulinas (*Figura 8*). Por el contrario, las diferencias en relación con la expresión de los receptores EphA4, EphB2 y EphB6 o del ligando ephrinA4 no eran estadísticamente significativas (no mostrado).

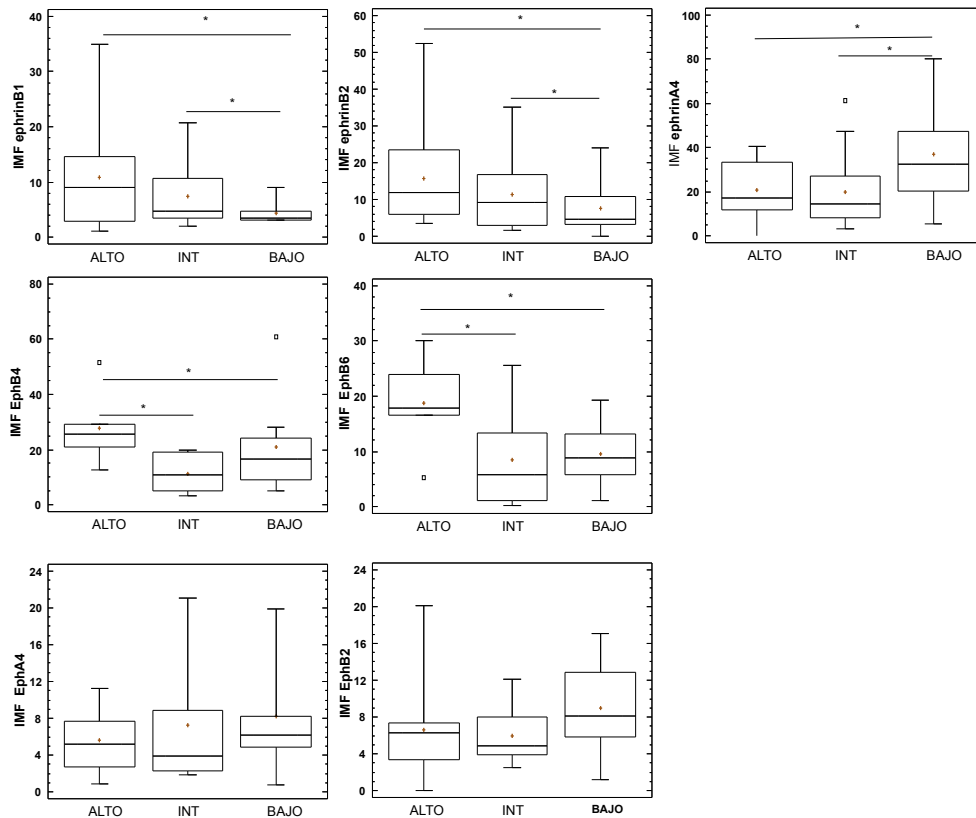


Figura 7. Análisis de la expresión de los miembros destacados de la familia Eph/ephrin en LLC-MO en relación con el estadio de RAI de cada paciente. La IMF de ephrinB1, ephrinB2, ephrinA4, EphB4, EphB6, EphA4 y EphB2? se analizó en relación al estadio de RAI modificado de cada paciente. Se analizó la significancia estadística de las diferencias entre los grupos de riesgo alto, intermedio y bajo, mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

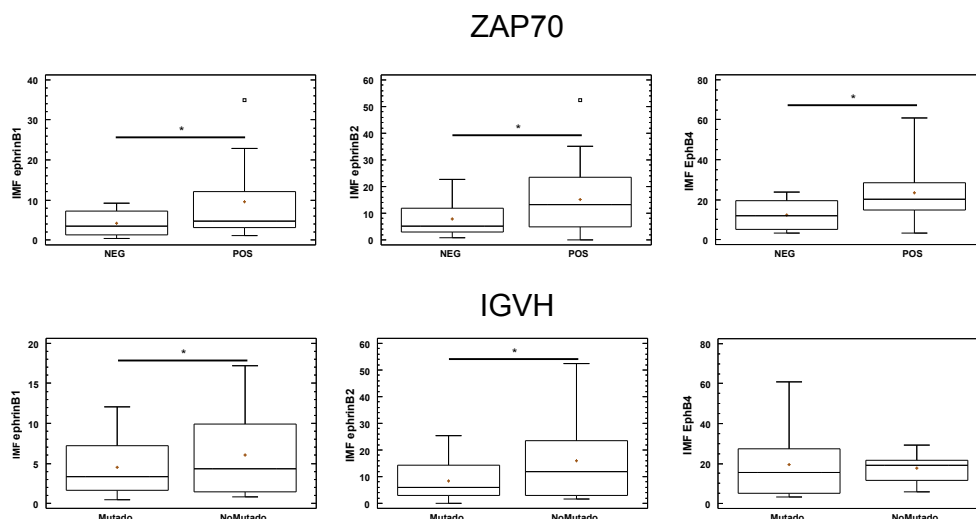


Figura 8. Análisis de la expresión de ephrinB1, ephrinB2 y EphB4 frente a la expresión de ZAP70 y el estado mutacional IGVH. Comparativa de la IMF de Eph/ephrinB analizada por citometría de flujo en relación con los parámetros de pronóstico ZAP70 (negativo o positivo) e IGVH (mutado, no mutado). La significancia estadística de los resultados se validó mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Teniendo en cuenta la expresión diferencial de algunas moléculas en función de su localización tisular en sangre periférica o médula ósea, especulamos con la idea de que pudiesen jugar un papel específico dentro del microambiente medular. Por ello analizamos la expresión de receptores en ligandos en relación al patrón de infiltración que presentaba cada uno de los pacientes, distinguiéndose entre nodular, intersticial, mixto o difuso. Los resultados representados en la figura 9 mostraron que los ligandos de la subfamilia B ephrinB1 y ephrinB2 estaban incrementados cuando el patrón de infiltración era de tipo intersticial o nodular. En el caso de ephrinA4 no se encontró ningún patrón diferencial a pesar de su elevada expresión en las células LLC. En cuanto a los receptores, únicamente EphA4 se encontraba significativamente aumentada en pacientes con infiltración nodular, aunque tanto EphB2 como EphB4 seguían la misma tendencia encontrándose elevada su expresión en casos de infiltración intersticial.

PATRÓN DE INFILTRACIÓN MEDULAR

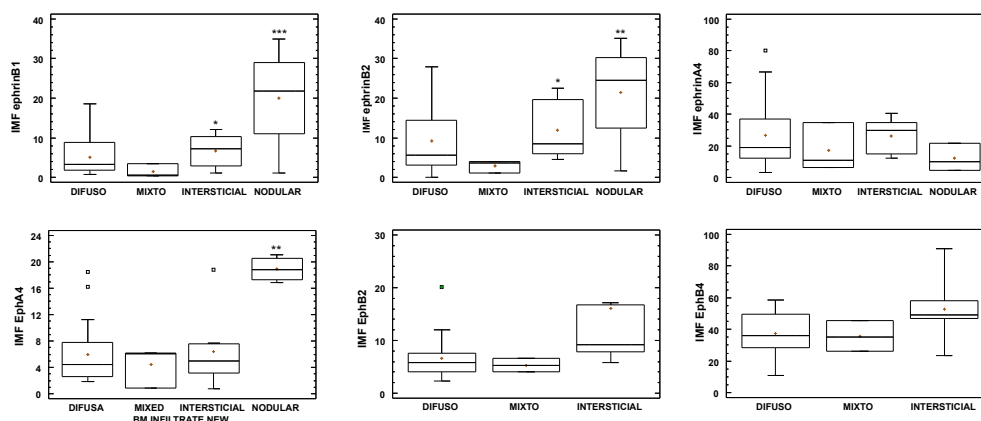


Figura 9. Comparativa de la expresión de los ligandos y receptores más relevantes de la familia Eph/ephrin en MO, en los distintos patrones de infiltración medular descritos en los pacientes de LLC. Gráficos de cajas y bigotes representando las diferencias en la IMF de ephrinB1, ephrinB2, ephrinA4, EphA4, EphB2 y EphB4 entre los pacientes con infiltración nodular, intersticial, mixto o difuso. La significancia estadística de las diferencias entre las medias o las medianas se determinó mediante el test de Kruskal-Wallis.

En contraposición con estos resultados, al analizar la expresión de estas moléculas frente a características clínicas como la presencia o ausencia de adenopatías, o la ocurrencia de esplenomegalia o hepatomegalia, no se encontraron diferencias significativas (no mostrado) lo que parecía confirmar la implicación concreta de Eph/ephrinB en el desarrollo de la enfermedad dentro del nicho tumoral de médula ósea.

Los resultados de los análisis mediante qPCR y citometría de flujo sugerían que ephrinB2 podía ser una molécula clave en el transcurso de la enfermedad, especialmente en médula ósea. En vista de la expresión diferencial de esta molécula en la superficie de las células LLC, decidimos analizar las posibles correlaciones con la clínica del porcentaje de la subpoblación ephrinB2^{high} en los pacientes. De forma significativa, observamos que su relación con los parámetros clínicos era similar a la de los niveles de expresión de ephrinB2 en la población LLC mayoritaria. La proporción de esta sub-población era mayor en los pacientes que presentaban positividad para ZAP70 y en aquellos con las cadenas IGVH no mutadas (*Figura 10-i*). Más aun,

disminuía significativamente en los pacientes en los que el grado de infiltración llegaba a ser difuso y correlacionaba de forma inversa con el grado de infiltración medular, (Figura 10-ii). Por el contrario, no encontramos asociación entre el número de estas células y las alteraciones citogenéticas analizadas (del17p, del11q, del13q y trisomía del 12).

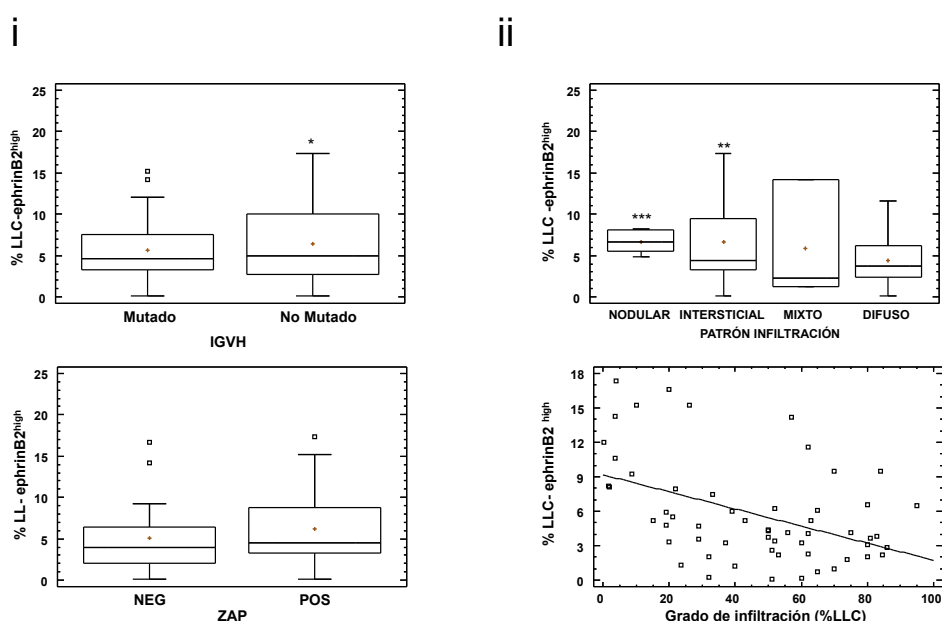


Figura 10. Análisis de la relación de la proporción de células ephrinB2^{high} con características clínicas de la LLC. (i) Gráficos de cajas y bigotes representando el porcentaje de células con una expresión elevada de ephrinB2, determinado por citometría de flujo, frente al estado mutacional IGVH y la positividad de ZAP70. **(ii)** Diagrama de cajas y bigotes representando la relación entre la sub-población de ephrinB2^{high} y el patrón de infiltración medular. Gráfico de correlación entre el porcentaje de células ephrinB2^{high} y el grado de infiltración de LLC en médula ósea.

2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES QUE SUSTENTAN VIABILIDAD DE LAS LLC IN VITRO, POR SU POSIBLE PAPEL IN VIVO, DE SU EXPRESIÓN DE Eph/ephrin EN RELACIÓN CON EL DE LAS LLC Y SI LOS MISMOS INTERVIENEN TAMBIÉN EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS

Diversas poblaciones celulares conforman el microambiente de médula ósea que alberga a las células LLC. Comúnmente, estas poblaciones celulares se han denominado estroma (BMSC, del inglés Bone Marrow Stromal Cells) y numerosos estudios las identifican como responsables de la supervivencia de las células LLC por su papel en la protección frente a la apoptosis tanto espontánea como inducida por fármacos citostáticos y por tanto manteniendo la enfermedad residual a partir de la que se desencadenan las recidivas de la enfermedad tras los distintos tratamientos (Burger, 2011). Nos propusimos determinar qué tipos celulares son responsables mayoritariamente del sostenimiento de la viabilidad de las células LLC tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.1.- Análisis del papel de los endotelios en la supervivencia de las LLC

El papel de los endotelios en la supervivencia de las células LLC mediante la secreción de factores solubles y a través de contactos intercelulares, ha sido discutido por distintos autores (Buggins y cols., 2010, Maffei y cols., 2011). Decidimos analizar el papel del endotelio en el mantenimiento de la viabilidad de las LLC *in vitro*, en co-cultivos sobre monocapas de células HUVEC en condiciones basales o estimuladas con TNF- α . El análisis de la supervivencia por citometría de flujo mediante doble tinción con Anexina-V y 7AAD, se realizó a partir de 12 horas de co-cultivo y hasta 5 días después. En concordancia con los datos de la bibliografía, observamos como los efectos pro-supervivencia de las HUVEC en condiciones basales, y en menor medida de las estimuladas con TNF- α no se ponían de manifiesto hasta 48h después del inicio del co-cultivo (*Figura 11-i*). Más aún, las células endoteliales en condiciones inflamatorias inducían un descenso de la viabilidad, respecto a los porcentajes observados en el cultivo de células LLC

solas en suspensión, durante las primeras 12 horas. Para discriminar los efectos de los factores soluble en la supervivencia frente a los de los contactos directos entre ambos tipos celulares, las HUVEC fueron fijadas con paraformaldehído de manera que en esta condición los resultados observados se deberían exclusivamente a los contactos intercelulares. La fijación contrarrestaba de forma clara los efectos pro-supervivencia de las HUVEC en condiciones basales y además prolongaba la inducción de muerte de las endoteliales tratadas con TNF- α durante los 5 días de cultivo (*Figura 11-i*).

En vista de que estos resultados apuntaban un papel preferente de los factores solubles secretados por los endotelios en la supervivencia de las células LLC *in vitro*, decidimos realizar un ensayo en el que recuperábamos los medios condicionados tras el co-cultivo durante 5 días de linfocitos LLC y HUVEC en condiciones basales. Estos medios se añadieron a nuevos cultivos de células leucémicas solas o co-cultivadas con HUVEC en condiciones basales o inflamatorias, en los que se analizó la supervivencia transcurridas 12 horas (*Figura 11-ii*). De manera significativa, el medio condicionado incrementaba la supervivencia de las células LLC en todas las situaciones, en relación con la viabilidad detectada en los cultivos con medio control. Estos resultados confirmaban que la supervivencia inducida por las HUVEC era dependiente de la acumulación, a lo largo del tiempo, en el medio de factores solubles pro-supervivencia.

Con la intención de clarificar hasta que punto la disminución de la viabilidad de las células LLC observada en los co-cultivos con endoteliales estimuladas con TNF- α podía afectar la supervivencia de las LLC a largo plazo, las células leucémicas se retiraron del co-cultivo con HUVEC en condiciones inflamatorias, a distintos intervalos de tiempo, manteniéndose en cultivo en medio completo hasta 12 horas más tarde, momento en el que se analizó el porcentaje de células doble negativas para Anexina-V y 7AAD. En la figura 11-iii puede verse como la viabilidad disminuía en las células LLC proporcionalmente al tiempo que habían pasado en cultivo junto con las HUVEC tratadas con TNF- α . Además, 2 horas en co-cultivo en estas

condiciones eran suficientes para desencadenar en ellas mecanismos de apoptosis que se revertían una vez que se mantenían en cultivo solas.

En definitiva, podemos deducir las células endoteliales promueven la supervivencia de las células LLC mediante la secreción de factores solubles, promovida por el contacto prolongado entre ambos tipos celulares en la infiltración de la médula ósea. Sin embargo, en procesos en los que el contacto es breve, insuficiente para desencadenar la producción de estos factores, la disminución en la viabilidad observada es consecuencia de la inducción de señales pro-apoptóticas, por parte de las HUVEC activadas, en las células LLC.

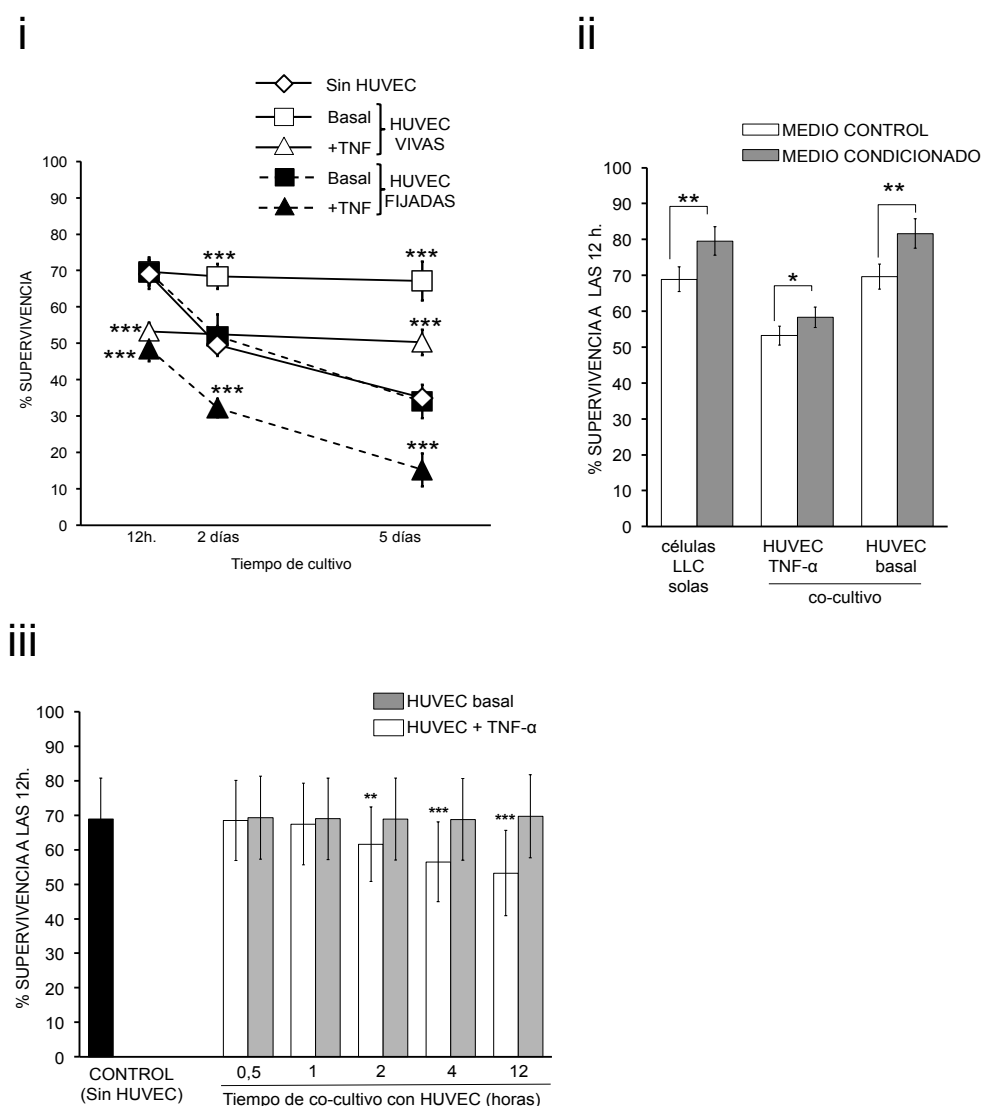


Figura 11. Las células HUVEC sostienen la viabilidad de las células LLC mediante la producción de factores solubles pro-supervivencia. (i) las células LLC se sembraron sobre monocapas de células HUVEC, vivas o fijadas con paraformaldehído, en condiciones basales o estimuladas con TNF- α (10 ng/mL). La viabilidad de las LLC se comprobó por citometría de flujo mediante tinción con Anexina-V y 7AAD, comparándose con la supervivencia de las células LLC cultivadas solas en suspensión. (ii) Células LLC cultivadas solas o en co-cultivo con HUVEC en condiciones basales o inflamatorias, con medio condicionado por el co-cultivo de 5 días de LLC y HUVEC en condiciones estándar, estimuladas o no con TNF- α , o con medio control. Las células LLC se retiraron del co-cultivo con HUVEC estimuladas o no con TNF- α , a distintos tiempos, permaneciendo en cultivo en medio solas hasta transcurridas 12 horas, para el análisis de su viabilidad. Representamos la media y desviación estándar de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba T-student para muestras pareadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2.- En LLC, las células mesenquimales son el tipo celular mayoritario que conforma el microambiente de médula ósea

En vista de los resultados obtenidos con las células endoteliales, decimos analizar qué otros tipos celulares presentes en el microambiente en la LLC podrían sostener la supervivencia de las LLC, fundamentalmente mediante contactos directos. Para ello, establecimos cultivos a partir de las células mononucleadas obtenidas de aspirados de médula ósea o de las suspensiones resultantes de la digestión con liberasa de fragmentos de biopsias de médula ósea de pacientes LLC en los casos en los que fue posible obtener este último material. En la figura 12 se muestran las imágenes de campo claro que ilustran las distintas poblaciones celulares obtenidas después de 2-3 semanas de cultivo. Tras retirar las células no adherentes, mayoritariamente observamos numerosas células de gran tamaño semejantes a fibroblastos a las que se encontraban adheridas agrupaciones de células redondeadas de pequeño tamaño, que incluso podían observarse debajo de las células de gran tamaño como resultado de fenómenos de emperopolesis. El análisis por citometría de flujo de las distintas poblaciones mostró que las células grandes eran mayoritariamente CD45 negativas y células pequeñas CD45 positivas correspondientes con linfocitos LLC.

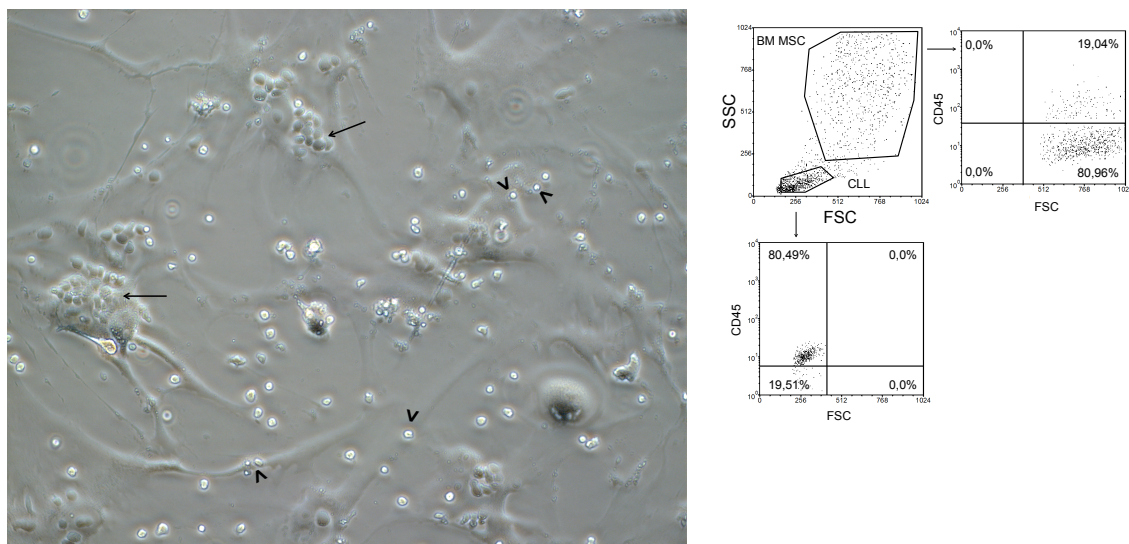


Figura 12. Cultivos de las suspensiones celulares obtenidas de aspirados de médula ósea. (i) Imagen de campo claro (magnificación 40x) de los cultivos de las células obtenidas en los aspirados de médula ósea, tras retirar las células no adherentes. Observamos células de pequeño tamaño adheridas a células tipo fibroblasto (puntas de flechas) o debajo de éstas (flechas). **(ii)** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones del cultivo incubadas con anticuerpos anti-CD45 conjugados directamente a fluorocromos y seleccionadas por FSC.

Para poder determinar el fenotipo de las células de gran tamaño obtenidas en nuestros cultivos, en primer lugar retiramos las células no adheridas para enriquecer la fracción adherente que se mantuvo en cultivo durante varios días. Tras recuperar nuestras células de interés, las incubamos con anticuerpos monoclonales contra las moléculas que caracterizan los tipos celulares que esperábamos encontrar en los cultivos de médula para su análisis en el citómetro habiendo acotado la población de interés en base a su tamaño/complejidad. En la figura 13 se muestran los *dot plots* representativos con los distintos marcadores enfrentados a la expresión de CD45. Nuestros resultados confirmaron que, a diferencia de otros trastornos linfoproliferativos en los que la población mayoritaria está compuesta por las llamadas *Nurse Like Cells* (NLCs) CD68⁺ de origen mieloide (Ruan y cols., 2006), o por células foliculares dendríticas (FDCs) en el estroma derivado de muestras de pacientes de LLC, la población mayoritaria se corresponde con células negativas para CD45 pero CD90, CD73, CD105, Nestina, CD146 y STRO-1 positivas, lo que

concuera con las características que definen al fenotipo mesenquimal (Kurtova y cols., 2009).

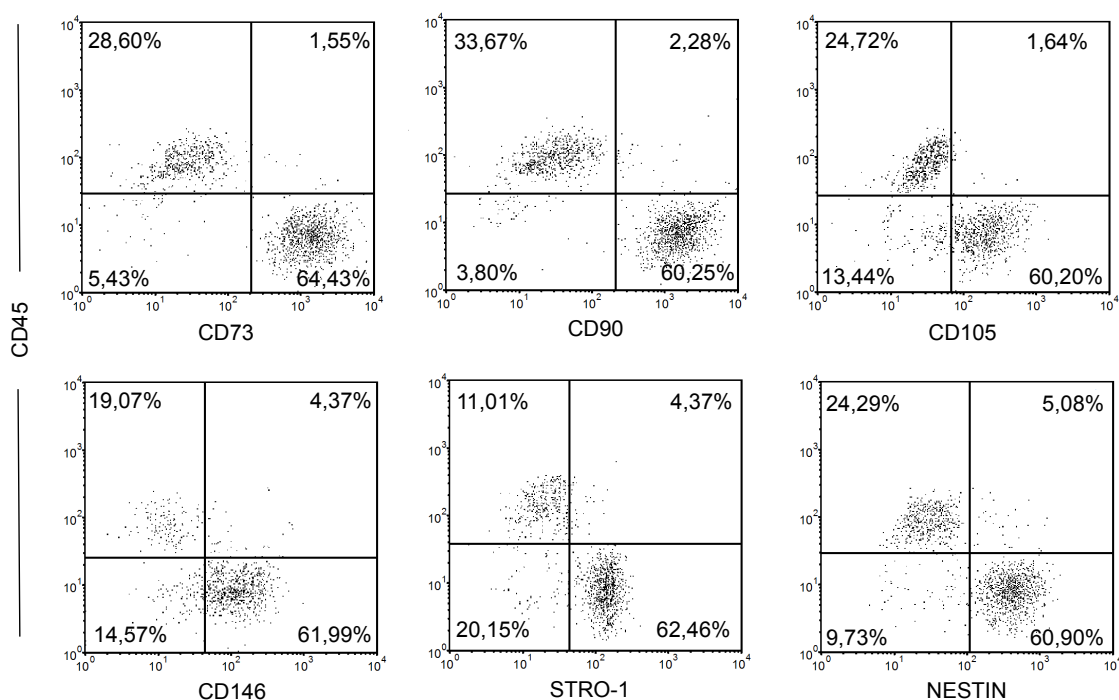


Figura 13. Caracterización del fenotipo de las BMMSC obtenidas a partir de los cultivos de células LLC de aspirados o biopsias de médula ósea. Las células se recuperaron de los cultivos después de 2-3 semanas en medio completo en condiciones estándar, mediante sucesivos lavados con PBS-EDTA. A continuación se incubaron con anticuerpos monoclonales contra CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, STRO-1 y Nestin conjugados directamente a fluorocromos para su análisis en el citómetro de flujo. Mostramos dot plots representativos de los resultados indicando los porcentajes de cada población.

2.3.- Las células mesenquimales del estroma de médula ósea (BMMSC) de pacientes de LLC sobre-expresan VCAM-1, CXCL12, BAFF y APRIL frente a las derivadas de donantes sanos

Distintos estudios han comparado las características fenotípicas, así como su capacidad protectora, del estroma LLC frente al de donantes sanos (Trimarco y cols., 2015). Aunque algunos autores sí han descrito diferencias en relación a la capacidad de sostener la viabilidad de las células LLC protegiéndolas de la apoptosis espontánea o inducida por fármacos, éstas no

están claras y no hay evidencias de que se deban a características intrínsecas a las propias células mesenquimales sanas.

Una vez que habíamos confirmado que la población mesenquimal era el componente mayoritario del estroma de médula ósea en pacientes de LLC (BMMSC-LLC) decidimos comparar sus características con las de las células mesenquimales obtenidas a partir de muestras de donantes sanos (BMMSC-sanas). La expansión de esta población se llevó a cabo previa depleción de las células CD45 positivas del cultivo original.

En la figura 14-i se muestran los histogramas superpuestos del estroma LLC y sano, mostrando la IMF de cada marcador tras el análisis en el citómetro de flujo. Las BMMSC-LLC y las BMMSC-sanas expresaban con la misma intensidad los marcadores característicos de esta población (CD90, CD73, STRO-1, Nestin, CD105 y CD146), así como moléculas implicadas en la adhesión como ICAM-1 y CD44. De forma interesante, observamos que la expresión de VCAM-1 y CD166 (ALCAM) en membrana, así como la expresión citoplásmica de CXCL12, BAFF y APRIL estaba incrementada en las BMMSC de LLC. Además confirmamos la expresión en membrana de BAFF pero no de APRIL en BMMSC, también aumentada en las muestras de LLC.

Por otro lado, evaluamos la supervivencia de las células LLC en co-cultivos con BMMSC-LLC y BMMSC-sanas mediante tinción con Anexina-V y 7AAD y posterior análisis en el citómetro de flujo. Como puede observarse en la figura 14-ii, la capacidad protectora del estroma LLC era significativamente más elevada, especialmente en el caso de las células LLC obtenidas de aspirados de médula ósea frente a las obtenidas de sangre periférica. Estas diferencias funcionales del estroma LLC podrían estar justificadas en cierta forma por la expresión diferencial de las moléculas pro-supervivencia descrita previamente, como ya ha sido sugerido por (Pontikoglou y cols., 2013).

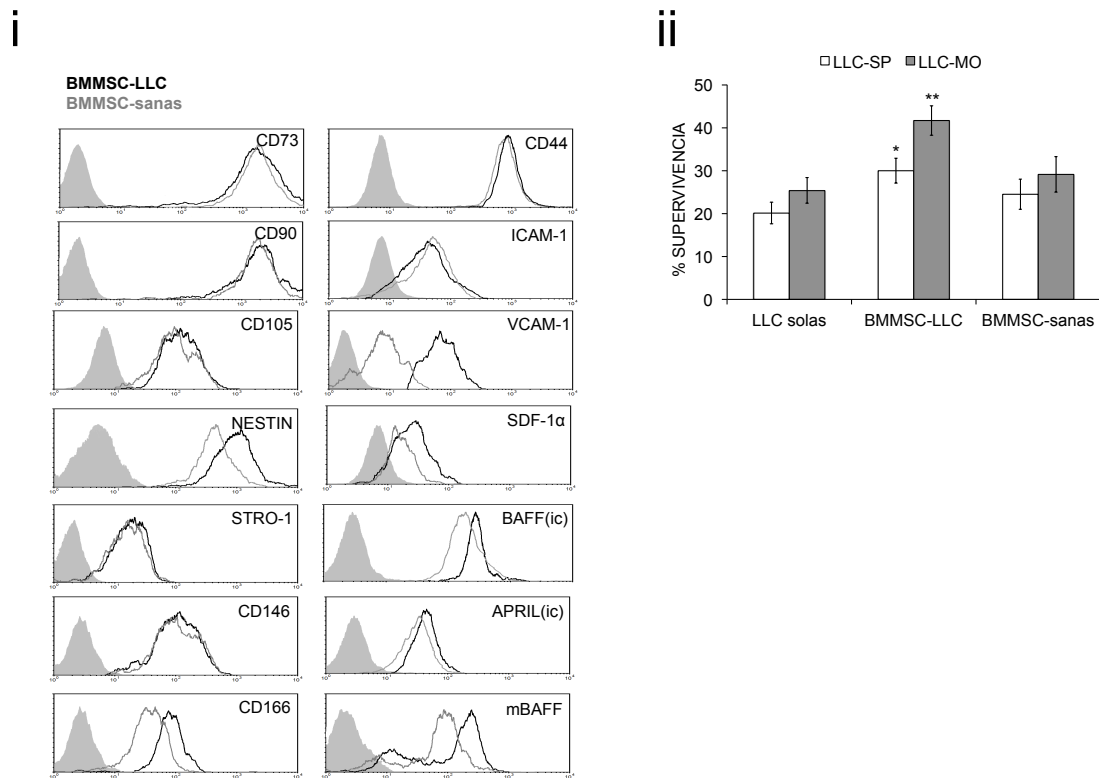


Figura 14. Las BMMSC-LLC sobre-expresan moléculas pro-supervivencia en relación a las BMMSC-sanas, sosteniendo preferentemente la viabilidad de los linfocitos LLC. (i) Las células CD45⁺ aisladas del cultivo de aspirados medulares de pacientes LLC (perfil negro) o donantes sanos (perfil gris), se incubaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromo para los marcadores que caracterizan el fenotipo mesenquimal y para moléculas relacionadas con rutas de supervivencia. Mostramos el análisis de dos muestras representativas. El perfil gris relleno se corresponde con la IMF del isotipo control para cada tinción. **(ii)** Análisis de la viabilidad de linfocitos LLC cultivados solos en medio completo o en co-cultivo con BMMSC-LLC o BMMSC-sanas, a las 72h mediante tinción con AnexinaV-PE y 7AAD, seleccionando las células doble negativas en el citómetro de flujo. Los gráficos de barras corresponden al promedio y desviación estándar de 3 experimentos realizados de forma independiente. La significancia estadística se determinó mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05; **p< 0,01.

2.4.- Las BMMSC derivadas de pacientes LLC expresan altos niveles de EphB4

El papel de los receptores Eph y sus ligandos, ephrins, ha sido ampliamente descrito procesos de adhesión/repulsión celular entre distintos tipos celulares modificando su posicionamiento durante el desarrollo así como su capacidad de supervivencia y/o proliferación. Así mismo estas moléculas se han descrito como supresores y promotores de procesos cancerígenos (Pasquale, 2010). En concreto, cada vez más trabajos relacionan EphB4 con los procesos de hematopoyesis y osteogénesis (Wang y cols., 2014, Nguyen y cols., 2015). Nuestros resultados del análisis de la expresión de Eph/ephrin en linfocitos LLC daban un papel destacado a ephrinB2 dentro del nicho de médula ósea, por lo que parecía lógico tratar de identificar a sus posibles receptores entre las poblaciones de estroma del microambiente.

En primer lugar, aislamos el ARN total de las BMMSC purificadas a partir de los cultivos de muestras de aspirados de médula ósea de 7 pacientes LLC. También incluimos ARN de las líneas celulares de estroma humano Hs5 y Hs27a por compartir características similares al estroma LLC de nuestros cultivos primarios. Analizamos la expresión de los receptores Eph que pudiesen interaccionar con ephrinB2 expresada por las células LLC-MO. Como habíamos determinado con las células LLC de pacientes, el análisis por qPCR se realizó en tarjetas microfluídicas TLDA (Applied Biosystems) diseñadas con cebadores específicos para identificar todas las isoformas descritas de cada una de las moléculas de interés (Anexo). Los valores de DDCT se relativizaron a los valores de BMMSC-sanas. De forma relevante, mientras que los niveles de EphB1, EphB2 y EphB3 eran similares o incluso ligeramente inferiores en las muestras de estroma LLC frente a las obtenidas de individuos sanos, la cantidad de ARNm de EphB4 y en menor medida de EphB6, se veía claramente aumentada en el estroma de los pacientes LLC (Figura 15-i)

Al evaluar las expresiones a nivel de proteína por citometría de flujo confirmamos la elevada expresión de EphB4, pero no de EphB6, en los

Resultados

pacientes LLC (Figura 15-ii) y más aún que la población positiva para EphB4 presentaba altos niveles de BAFF, APRIL y CXCL12 intracitoplásmicos. Así mismo, confirmamos la expresión de EphB4 en ambas líneas de estroma, aún siendo mucho más elevada en la Hs27 (Figura 15-iii).

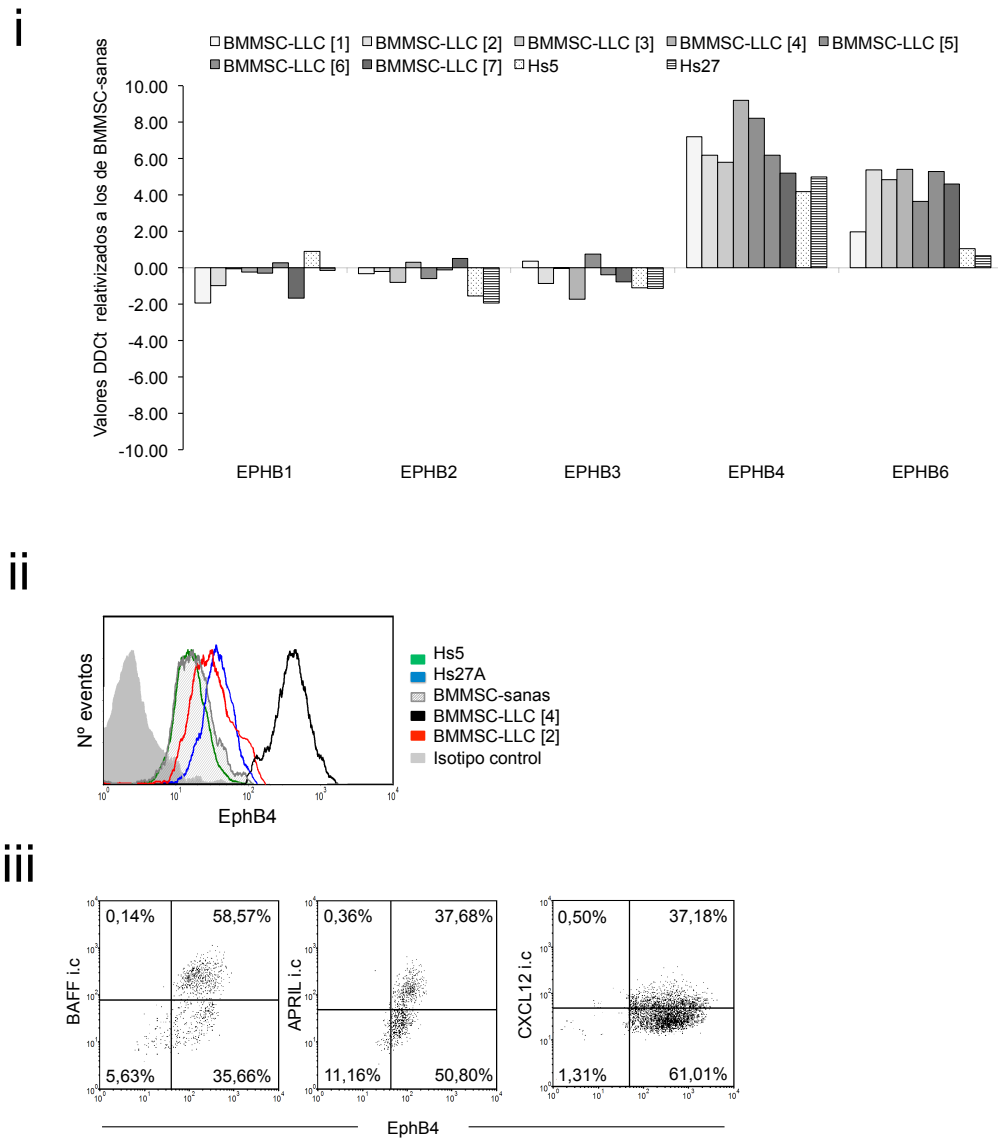


Figura 15. Las BMMSC-LLC sobre-expresan EphB4. (i) Análisis de la expresión por qPCR de los receptores EphB en BMMSC de 7 pacientes LLC y en las líneas de estroma Hs5 y Hs27. La cantidad de mensajero para cada molécula se cuantificó en el sistema TLDA. Los valores de DDCT de cada muestra se relativizaron a los de BMMSC-sanas. (ii) Suspensiones de BMMSC obtenidas a partir de cultivos de aspirados de médula ósea, se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra EphB4 conjugado directamente a fluorocromos. Mostramos la IMF de EphB4 de las muestras de 2 pacientes LLC, un donante sano y las líneas Hs5 y Hs27. (iii) Dot-plots representativos del análisis de la expresión intracelular de BAFF, APRIL y CXCL12 en las BMMSC EphB4⁺ de un paciente LLC.

2.5.- Las BM-MSc EphB4 positivas están presentes en la médula ósea de los pacientes LLC

Una vez que habíamos caracterizado la población mesenquimal derivada del cultivo de muestras de pacientes de LLC y su capacidad de protección de las LLC frente a la apoptosis, nos propusimos identificar esta población *in vivo* mediante análisis por citometría de flujo. En el caso de las suspensiones obtenidas a partir de los aspirados de médula ósea, se nos plantearon dificultades técnicas debido a que el porcentaje de células con un posible fenotipo mesenquimal era muy escaso por la gran expansión de la población tumoral. Por ello, decidimos analizar las suspensiones obtenidas tras el procesamiento de fragmentos de biopsias de médula digeridos con liberasa.

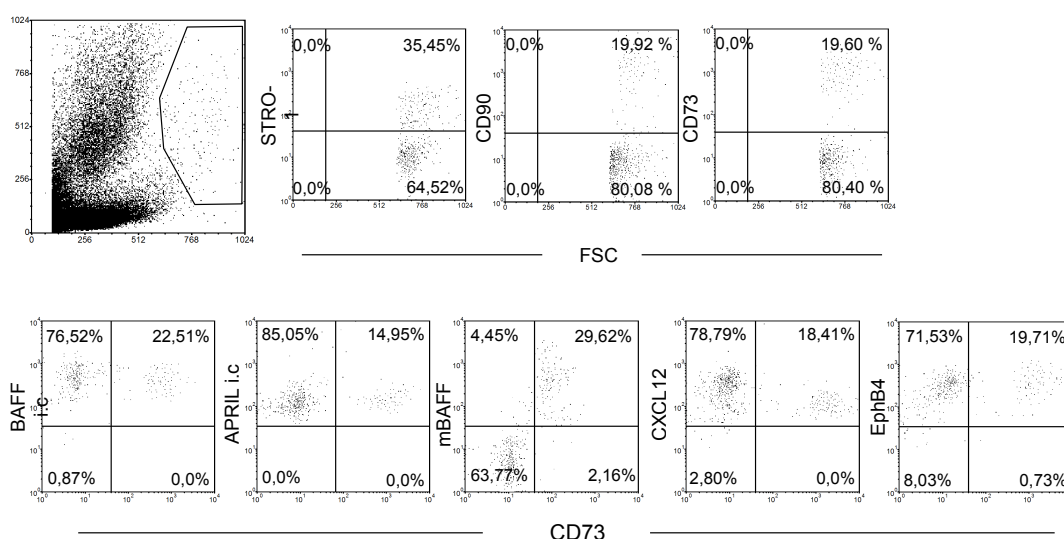


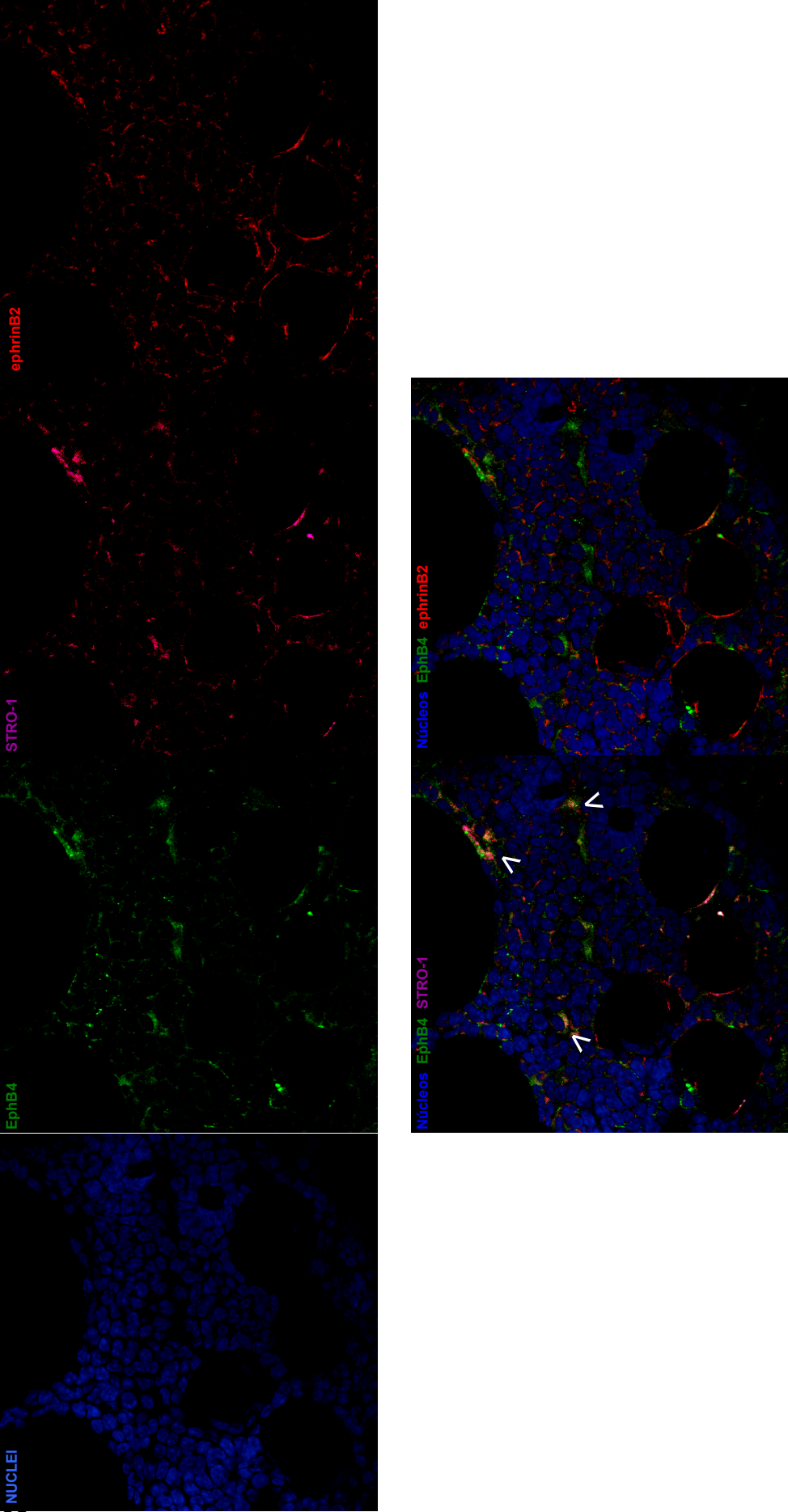
Figura 16. Confirmación de la presencia de BMMSC *in vivo* con características similares a la población encontrada en nuestros cultivos. Los *dot-plots* de la figura muestran el análisis por citometría de flujo de suspensiones de biopsias de médula ósea de pacientes de LLC, obtenidas tras el procesamiento enzimático con liberasa, incubadas con anticuerpos conjugados a fluorocromo. En la fila superior confirmamos la existencia de una población con fenotipo mesenquimal mientras que en la parte inferior de la figura se analiza la expresión de moléculas pro-supervivencia, así como de EphB4, en las células CD73⁺.

Como se muestra en la figura 16, en estas muestras pudimos observar la ocurrencia de una población claramente diferenciada de células de gran tamaño entre las que encontrábamos entre un 20-40% de células positivas para CD73, CD90 y STRO-1. Al analizar esta población, comprobamos que co-expresaban EphB4 y BAFF en su membrana y además producían gran cantidad de BAFF, APRIL y CXCL12, evaluada como la intensidad media de fluorescencia de su expresión intracitoplásmica. Por lo tanto, confirmamos que el fenotipo que observábamos en nuestros cultivos, y de forma relevante la existencia de una población mesenquimal claramente EphB4 positiva, está presente en la condición *in vivo* pudiendo ser responsable de la supervivencia de las LLC en el nicho tumoral.

2.6.- Existe una expresión diferencial de EphB4 en medula ósea relacionada con el patrón de infiltración.

El patrón de infiltración medular ha sido tradicionalmente considerado fundamental como valor pronóstico en la LLC, teniendo peor evolución aquellos pacientes en los que la infiltración es difusa frente a los que muestran un patrón nodular, aunque otras de sus características clínicas los situasen en el mismo estadio de la enfermedad (Rozman y cols., 1984).

Corroboramos en primer lugar nuestras observaciones por citometría de flujo, analizando también mediante microscopía confocal la presencia de las células mesenquimales con expresión de EphB4 en secciones de biopsias de médula ósea de distintos pacientes. Como se muestra en la figura 17, identificamos células STRO-1 y EphB4 positivas con las que interaccionaban células B LLC con amplia expresión del ligando ephrinB2.



Al analizar la expresión de EphB4 en biopsias d pacientes con diferente grado de infiltración medular observamos que, de forma llamativa, la ocurrencia de las células EphB4 positivas era mucho mayor en las biopsias en las que el patrón de infiltración era nodular/ intersticial, mientras que resultaba mucho más difícil encontrarlas en las muestras en las que la extensión de la masa tumoral ya se correspondía con un patrón difuso, modificando drásticamente la estructura del microambiente de médula ósea (Figura 18). Esto podría indicar un papel relevante de las células mesenquimales en el establecimiento del nicho tumoral a través de la interacción entre EphB4 y ephrinB2, que deja de ser fundamental una vez que la masa tumoral ya se ha extendido.

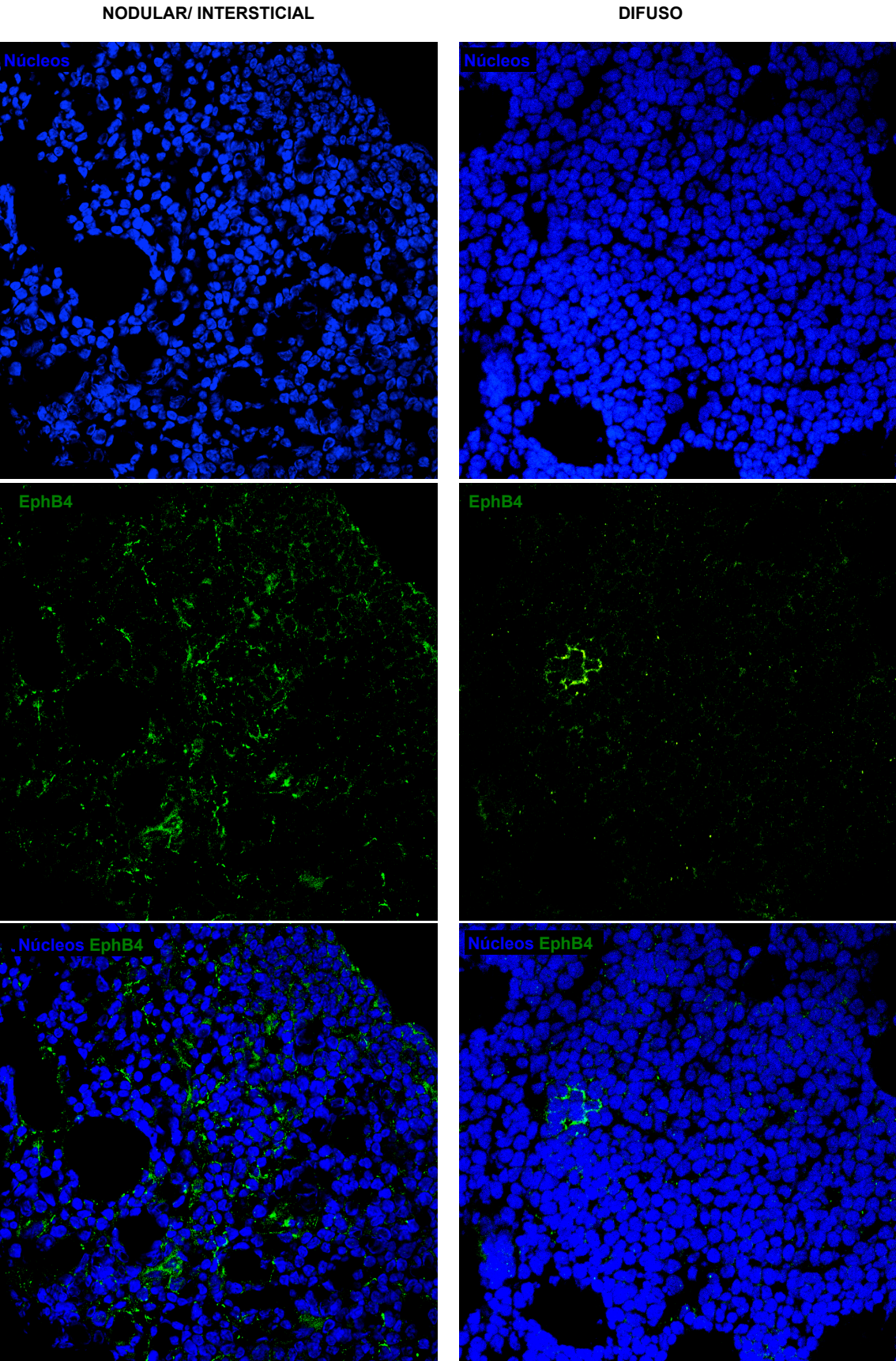
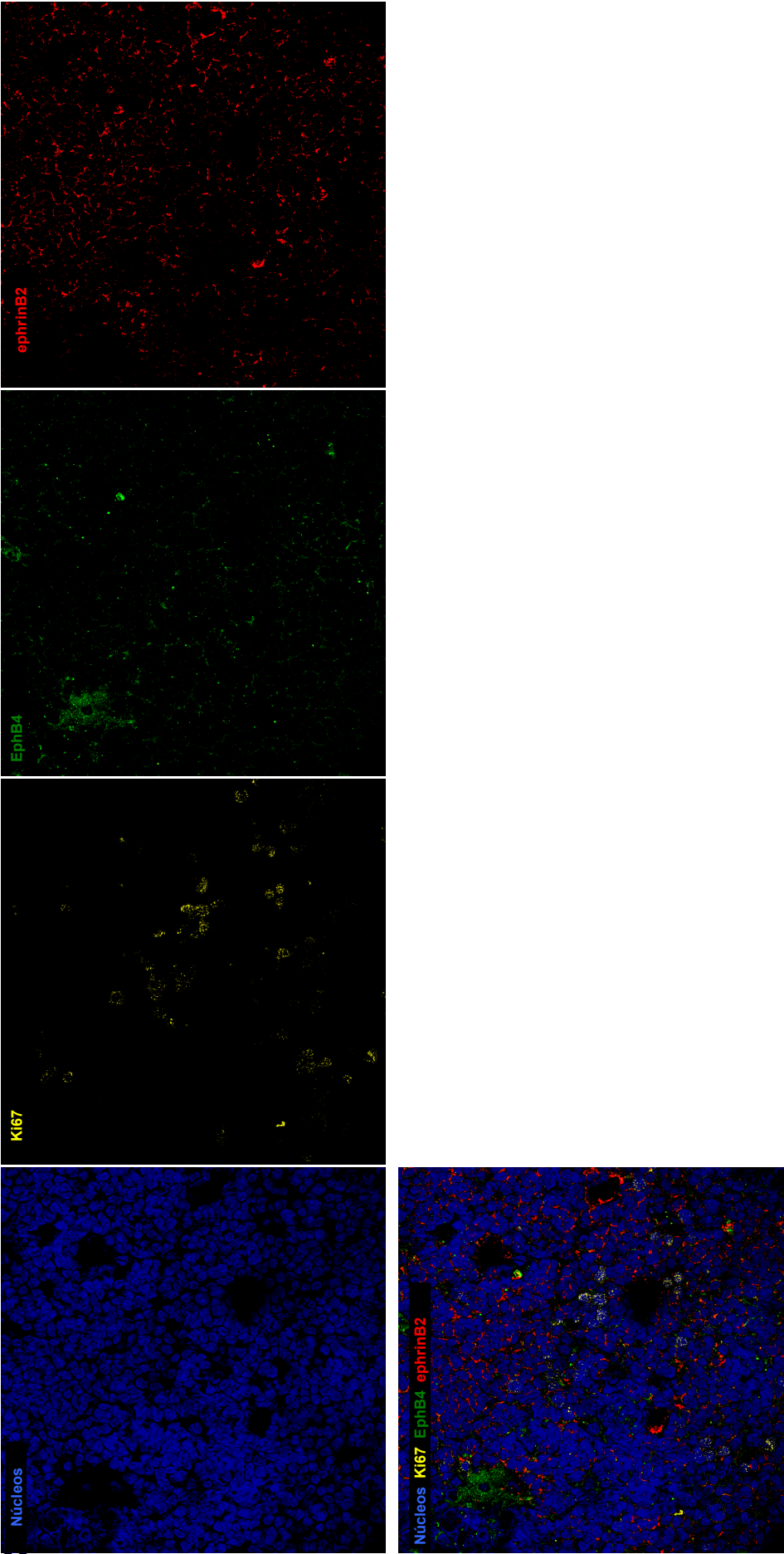


Figura 18. La frecuencia de BMMSC EphB4⁺ es mucho más elevada en biopsias con un patrón de infiltración nodular o intersticial. Secciones de biopsias de médula ósea de pacientes de LLC con distinto patrón de infiltración como se indica en la parte superior de la figura, se incubaron con un anticuerpo policlonal conejo- α EphB4 revelado con el correspondiente anti-suero- AF488. Los núcleos se contrastaron con Hoechst 33258. Imágenes obtenidas en un microscopio confocal Leica SP2.

2.7.- Linfocitos Ki67⁺ se encuentran alejados de las BMMSC-EphB4⁺.

A continuación nos preguntamos si estas células EphB4 positivas pudiesen constituir regiones dentro de la médula ósea que albergasen células LLC con alta capacidad proliferativa. Utilizamos el marcador Ki67 para tratar de identificar estas células en secciones de biopsias de médula ósea. De forma interesante, encontramos que las células Ki67⁺ no contactaban con las BMMSC EphB4⁺ (Figura 19). Más aún, las células ephrinB2^{high} no expresaban el marcador de proliferación. Por tanto, podríamos descartar que la red conformada por las células EphB4⁺ indujese la capacidad de proliferación de los linfocitos a través de la interacción con ephrinB2.



3.- ANÁLISIS DEL PAPEL DE LAS INTERACCIONES Eph/ephrin EN LA SUPERVIVENCIA Y/O RESISTENCIA A FÁRMACOS.

La familia de proteínas Eph/ephrin desempeña sus funciones a través de interacciones célula-célula que pueden dar lugar a una señal bidireccional que denominamos forward cuando se da hacia el interior de la célula que porta el receptor Eph en su membrana y reverse cuando desencadena cascadas de señalización en la célula que expresa el ligando, resultando en un papel autónomo o no autónomo de célula. Por tanto eran firmes candidatas para participar en la resistencia a la apoptosis mediada por contactos entre las células en la LLC dentro del microambiente tumoral, descrita ampliamente asumida (Lagneaux y cols., 1999).

3.1.- Las interacciones homotípicas entre Eph-ephrin B en las células LLC modulan su supervivencia. Importancia de la señalización reverse a través de ephrinB2.

Los datos de expresión y función de Eph/ephrin en las células del sistema inmune y en cáncer, así como su modulación por distintos estímulos, incluido el propio cultivo, son contradictorios. Nuestros resultados previos indicaban una expresión diferencial de Eph/ephrin en las células LLC obtenidas de sangre periférica y médula ósea. Tanto el ligando ephrinB2 como su receptor preferente EphB4 se expresaban en las células LLC, aunque resaltaba la sobre-expresión de ephrinB2 en las células LLC extraídas de médula ósea frente a las de sangre periférica.

La relevancia de las interacciones entre las propias células LLC no ha sido muy estudiada, a pesar de que el grueso de la masa tumoral se acumula en el torrente circulatorio fuera de los órganos linfoides como médula ósea o adenopatías. Sin embargo, sí existen algunos trabajos que han otorgado un papel diferencial a las interacciones homotípicas frente a los contactos con otros componentes del microambiente (Hutchinson y cols., 2014). Nos propusimos valorar si la familia Eph/ephrin podrían tener un papel relevante en estas interacciones, regulando la supervivencia de las células LLC.

En una primera aproximación, las células LLC obtenidas de aspirados de médula ósea, se cultivaron solas, en suspensión, añadiendo al medio de cultivo las formas solubles de las proteínas recombinantes Eph/ephrin en exceso (1 μ g/mL), con el objeto de bloquear las posibles interacciones intercelulares a través de estas moléculas. Por otro lado, las células LLC se cultivaron sobre las proteínas Eph/ephrin inmovilizadas sobre la superficie de cultivo (0.5 μ g/mL), con lo que de este modo se señalizaban las células a través del receptor o del ligando correspondiente. Valoramos los efectos de los distintos tratamientos, analizando la viabilidad de las células LLC tras 72 horas de cultivo, por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V y 7AAD.

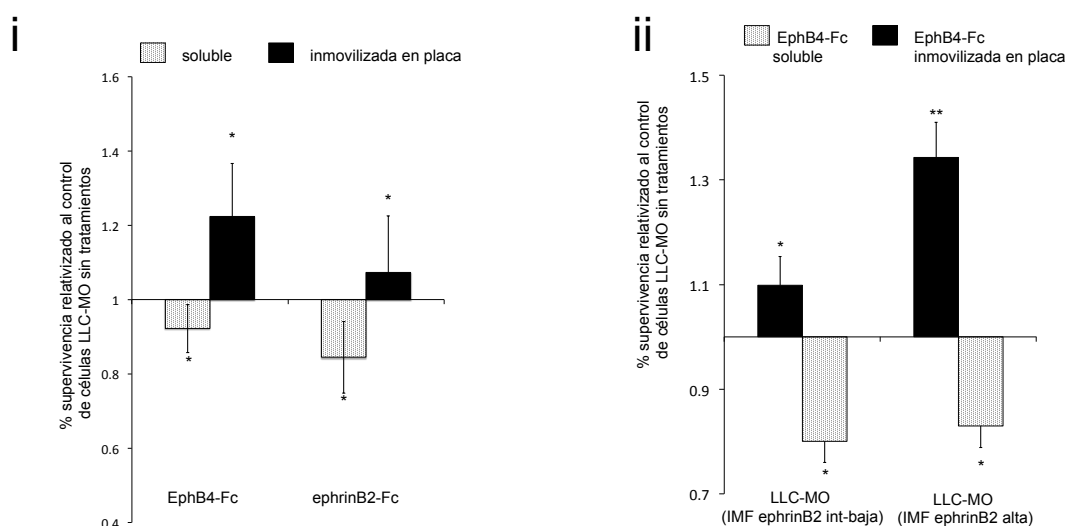


Figura 20. La señalización reverse a través de ephrinB2 induce un incremento en la viabilidad de las células LLC-MO. (i) Células LLC-MO se cultivaron junto con las proteínas recombinantes EphB4 o ephrinB2 en su forma soluble (1 μ g/mL) o inmovilizadas en placa (0,5 μ g/mL). (ii) Comparativa de los efectos del tratamiento con EphB4 en muestras LLC-MO con distinta expresión de ephrinB2 (intermedia-baja vs alta). La viabilidad se analizó por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V y 7AAD tras 72h de cultivo. Los efectos de los distintos tratamientos se relativizaron a la viabilidad de las células LLC cultivadas con fragmentos hFc. Se muestra el promedio más menos desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. La significación estadística fue valorada mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05; **p< 0,01; ***p<0,005.

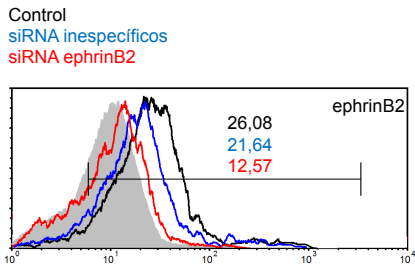
De manera interesante, las formas recombinantes solubles tanto del receptor EphB4 como del ligando ephrinB2 disminuían la viabilidad de las células LLC de médula ósea al bloquear las interacciones, mientras que EphB4-Fc inmovilizada en placa y en menor medida ephrinB2-Fc inducían un incremento en la supervivencia. Más aún, la supervivencia de las LLC cultivadas sobre EphB4-Fc inmovilizada en placa, se incrementaba de forma proporcional a la expresión de ephrinB2 en su membrana (Figura 20). Los efectos de las proteínas sobre las células LLC de sangre periférica no eran significativos.

Para confirmar el papel de ephrinB2 en estas interacciones, decidimos silenciar su expresión en las células LLC utilizando moléculas pequeñas de ARN de interferencia (siRNA) específicas para esta molécula. Como se muestra en la figura 21-i, la caída en la expresión, se confirmó por citometría de flujo 48 horas después de la nucleofección. La supervivencia de las células LLC de médula ósea silenciadas para ephrinB2 disminuía significativamente tras 5 días de cultivo en medio completo, sin añadir ningún estímulo, respecto a los controles de células sin tratar o nucleofectadas con siRNA inespecíficos. Sin embargo, la supervivencia no se veía modificada en las células obtenidas de sangre periférica (FIGURA 21-ii).

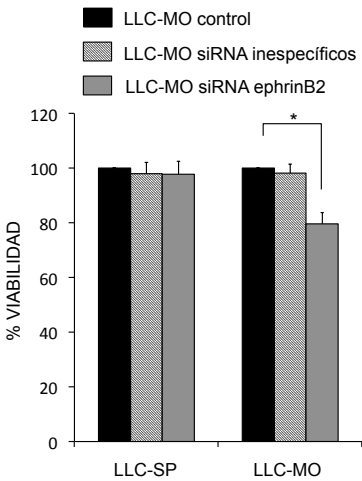
Por otro lado, en los cultivos de aspirados medulares de pacientes LLC, observamos la formación de agregados de múltiples células que no se encontraron en los cultivos de muestras procedentes de sangre periférica. El análisis por microscopía confocal de estos agregados, mostró la acumulación de ephrinB2 en las zonas de contacto entre las células LLC de médula ósea (FIGURA 21-iii).

Estos resultados ponían de relieve la importancia de las interacciones Eph-ephrin B entre las propias células LLC, denominadas interacciones homotípicas, en el mantenimiento de la masa tumoral en el microambiente de médula ósea. Más aún, sugerían un papel destacado de la señal *reverse* a través de ephrinB2 en los mecanismos de supervivencia de las LLC.

i



ii



iii

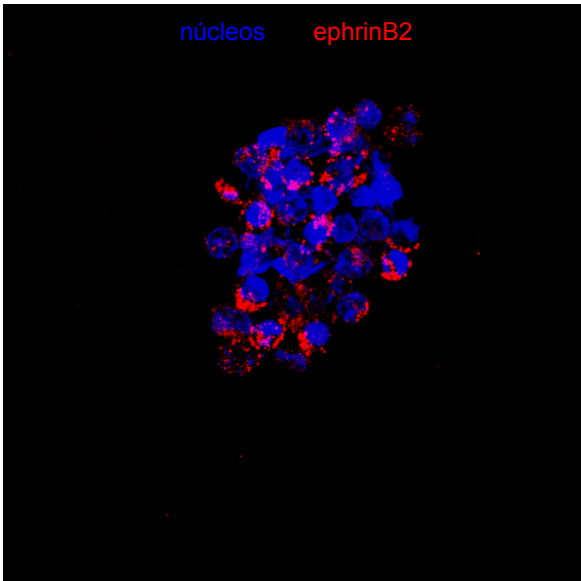


Figura 21. El silenciamiento de ephrinB2 mediante siRNA induce un descenso de la viabilidad de las células LLC-MO. (i) Células LLC recién extraídas de MO se nucleofectaron con siRNA inespecíficos como control o específicos para ephrinB2 (600nM). La caída de la expresión del ligando en la superficie celular se validó por citometría de flujo a las 48h. Los valores indican la IMF para cada condición. (ii) La supervivencia se evaluó por citometría de flujo como en apartados anteriores, tras 5 días de cultivo. Se representan los porcentajes considerando como 100% la viabilidad de las células LLC sin nucleofectar. La significancia estadística de la diferencia entre las medias de 3 muestras independientes se determinó mediante el test T-student $*p<0,05$; la ausencia de asteriscos se corresponde con la ausencia de significancia de los resultados. (iii) Imagen representativa de las inmunofluorescencias de agregados de células LLC-MO recuperadas de los cultivos primarios. Se utilizó un anticuerpo anti-ephrinB2 biotinilado revelado con SAV-AF488® y los núcleos se contrastaron con Hoechst 33258. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Leica SP2 con el objetivo de 40x.

3.2.- La expresión de ephrinB2 en las células LLC de médula ósea es dependiente del microambiente y del contacto con las células de estroma.

A continuación, decidimos evaluar el papel de Eph-ephrin B en la interacción de las células LLC con las células del estroma de médula ósea. Como ya hemos comentado, EphB4 se ha descrito como una molécula fundamental dentro del nicho hematopoyético. Más aún, algunos autores han descrito la capacidad de las células de estroma para modular la expresión de ephrinB2 en las células hematopoyéticas murinas mediante contactos intercelulares con EphB4 (Okubo y cols., 2006).

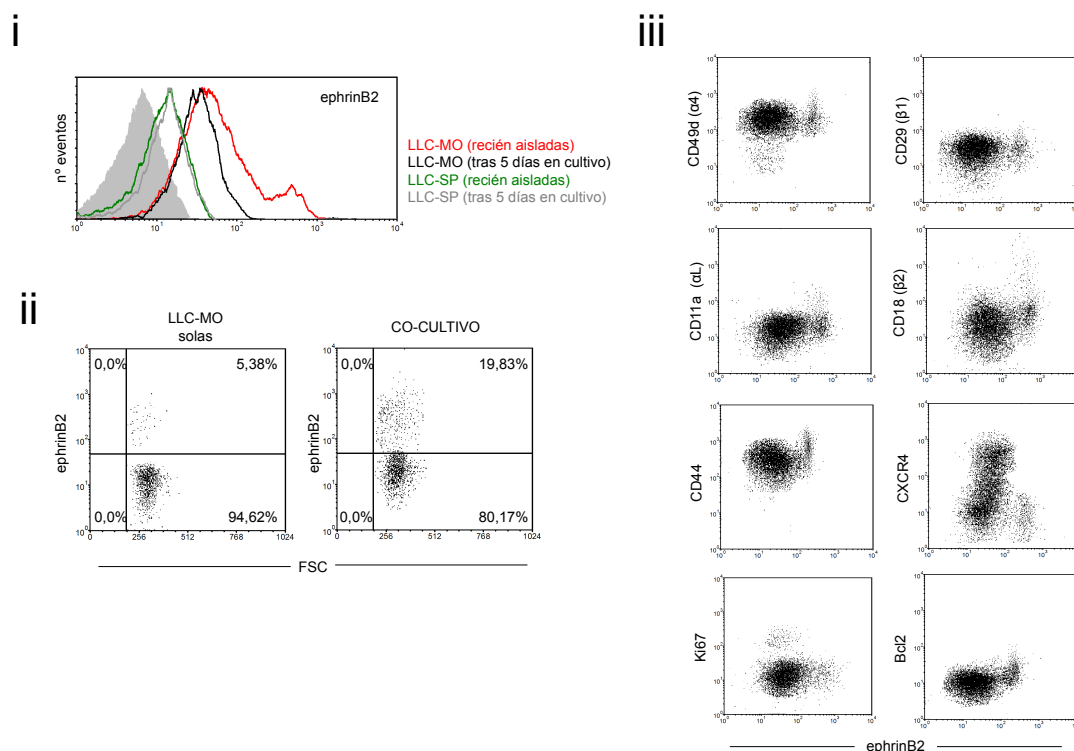


Figura 22. La expresión de ephrinB2 en las células LLC-MO es dependiente de estímulos proporcionados por el microambiente. (i) Análisis por citometría de flujo de la expresión de ephrinB2 en células LLC recién aisladas de MO y SP o después de 5 días en cultivo. Los perfiles vacíos corresponden a las distintas condiciones y el perfil relleno a la IMF del isotipo control. (ii) Dot-plots ilustrando la expresión de ephrinB2 en las células LLC-MO cultivadas solas o en co-cultivo con células de estroma. (iii) Análisis comparado de la expresión de ephrinB2 en las células LLC-MO frente a CD49d, CD29, CD11A, CD18, CD44, CXCR4, Bcl2 y Ki67. La figura muestra histogramas y dot-plots representativos de los resultados observados.

Nuestros análisis por citometría de flujo habían mostrado, además de la sobre-expresión de ephrinB2 en las células LLC de médula ósea frente a las de sangre periférica, la existencia de un perfil bimodal en las primeras, en las que detectábamos una población minoritaria con una expresión muy elevada de ephrinB2. De forma llamativa, al analizar la expresión de ephrinB2 en las células después de 5 días de cultivo, ésta caía significativamente en la población mayoritaria de médula ósea con una expresión intermedia (ephrinB2^{int}), aunque continuaba siendo más alta que la de sangre periférica (ephrinB2^{low}) y además, la población ephrinB2^{high} en médula ósea prácticamente desaparecía (Figura 22-i). Así mismo, al analizar la expresión de ephrinB2 en las células LLC co-cultivadas con estroma observamos que el co-

cultivo recuperaba los niveles de IMF de ephrinB2 en la población mayoritaria y más aún incrementaba el porcentaje de células LLC con una expresión elevada de ephrinB2 (Figura 22-ii). Estos resultados concordaban con los trabajos de otros autores que describían la baja o nula expresión de ephrinB2 en linfocitos periféricos en ausencia de estímulos (Zamora y cols., 2006).

A continuación analizamos por citometría de flujo el inmunofenotipo de las células CD19⁺/CD5⁺ recién aisladas de los aspirados de médula ósea de pacientes LLC en relación con su expresión de ephrinB2 (Figura 22-iii). De forma interesante, la sub-población ephrinB2^{high} poseía características que la diferenciaban de la población mayoritaria con una expresión intermedia de ephrinB2. Encontramos que la sobre-expresión de ephrinB2 era coincidente con una mayor expresión de las integrinas $\alpha 4$ y αL y sus correspondientes cadenas $\beta 2$ y $\beta 1$ así como con la expresión incrementada de CD44. Más aún, estas células mostraban una expresión muy disminuida del receptor CXCR4. Estos datos indicaban una mayor capacidad de adhesión de estas células que facilitase su retención en el nicho medular por lo que la menor presencia de receptores de quimioquinas en su superficie celular se debería a una sobreexposición a los ligandos secretados por los tipos celulares del microambiente de médula ósea. Por otro lado, al igual que habíamos observado por microscopía confocal en las biopsias de médula ósea, comprobamos que la sub-población ephrinB2^{high} no expresaba el marcador de proliferación Ki67, que quedaba restringido a una sub-población dentro de las células ephrinB2^{int}. Sin embargo, sí mostraba un elevado contenido de la molécula Bcl-2 lo que sugería su papel en la resistencia a fenómenos de apoptosis y supervivencia.

En conjunto, estos datos sugerían que la expresión de ephrinB2 en las células LLC, en especial la población ephrinB2^{high}, era dependiente de señales proporcionadas por el microambiente y podría tener un papel crítico en la interacción con las células del estroma.

3.3.- El contacto de las células LLC ephrinB2^{high} induce la señal *forward* a través de EphB4 en el estroma, potenciando la adhesión entre ambos tipos celulares y la retención de los linfocitos en la médula ósea

A tenor de los resultados anteriores, nos propusimos analizar los fenómenos de adhesión entre las células LLC y el estroma. Planteamos ensayos de conjugados con las líneas de estroma humano Hs5 y Hs27a, empleadas en distintos estudios en LLC por poseer varias de las características fundamentales encontradas en las células de estroma derivadas de pacientes. Las células LLC se incubaron previamente al co-cultivo con la molécula SNARF-1 mientras que las células de estroma fueron teñidas con Oregon Green, de forma que podíamos diferenciar claramente ambas poblaciones por su emisión de fluorescencia en el citómetro de flujo. Después de la tinción, ambos tipos celulares se co-cultivaron en suspensión en placas de fondo curvo durante 12 horas. Como se muestra en la Figura 23-i, el porcentaje de conjugados se determinó como la población doble positiva, dentro de las células grandes acotadas por tamaño y complejidad. Las células de estroma se trataron con TNF α para inducir una respuesta inflamatoria que facilitara las condiciones de adhesión (ref) y analizamos la formación de conjugados en ambas líneas en condiciones basales e inflamatorias. Nuestros resultados mostraron que los conjugados se formaban preferentemente con las células LLC de médula ósea y el porcentaje era significativamente mayor en los co-cultivos con la Hs27a y sobre todo cuando las células de estroma habían sido estimuladas con TNF α (Figura 23-i).

A continuación, decidimos evaluar el papel de ephrinB2 y EphB4 en este proceso. Dado el comportamiento diferencial de las células LLC de médula ósea y el incremento de la población ephrinB2^{high} tras el co-cultivo, nos planteamos que esta población pudiese tener una mayor capacidad de adhesión al estroma. Tras el co-cultivo de las células LLC con las líneas de estroma, analizamos la expresión de ephrinB2, en las células LLC que no formaban parte de los agregados (población simple positiva para SNARF-1) y en aquellas que formaban los conjugados, liberándolas mediante tratamiento

con PBS-EDTA. De forma muy interesante, en las células LLC que no habían constituido los agregados se perdía la población ephrinB2^{high} mientras que estaba enriquecida en la fracción de células LLC liberadas del estroma, confirmando una adhesión preferente de esta sub-población (Figura 23-ii).

El análisis por microscopía confocal de conjugados células LLC-Hs27a, constituidos sin teñir previamente las células, mostró la presencia de ephrinB2 y EphB4 en los sitios de contacto entre ambos tipos celulares (Figura 23-iv). Decidimos bloquear esta interacción pre-incubando bien las células LLC con un exceso de EphB4-Fc o bien las células Hs27a con un exceso de ephrinB2-Fc (1µg/mL), lavando las células con abundante medio de cultivo antes del inicio del co-cultivo. Como se muestra en la figura 23-iii, el porcentaje de conjugados disminuía significativamente si las células LLC habían sido incubadas con EphB4-Fc, en concordancia con los resultados de (Nguyen y cols., 2015). De forma sorprendente, el porcentaje de conjugados se veía muy incrementado si las células Hs27 se habían pre-tratado con ephrinB2-Fc. Estos resultados indicaban que podríamos estar ante un mecanismo por el cual la señalización *forward* a través de EphB4 en el estroma, mediada por ephrinB2, potenciaría la adhesión entre ambos tipos celulares.

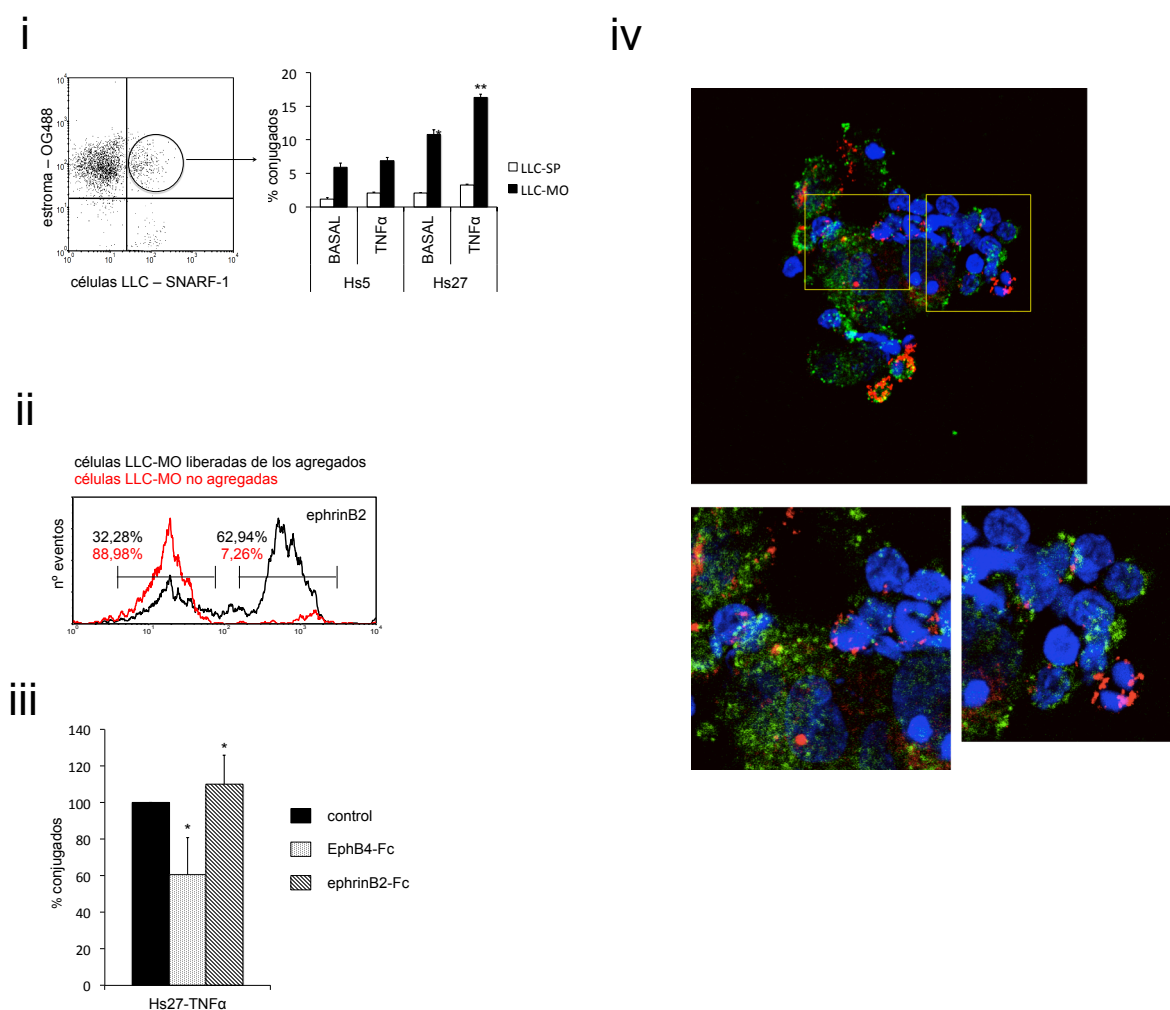


Figura 23. Las células LLC-MO se adhieren preferentemente a las células Hs27 en condiciones inflamatorias, en un proceso en el que está implicada la señalización Eph-ephrin B. (i) La figura muestra a la izquierda un dot-plot representativo de los ensayos de conjugados en los que las células LLC y las líneas de estroma se tiñeron con SNARF-1 y Oregon Green respectivamente. A la derecha se muestra el porcentaje de agregados células LLC-estroma generados en co-cultivos de 12 horas con las líneas Hs5 y HS27 en condiciones basales e inflamatorias. (ii) Análisis por citometría de flujo de la expresión de ephrinB2 en las células LLC-MO que habían constituido o no los agregados con las líneas de estroma. (iii) Las células LLC-MO y las Hs27 se pre-incubaron con las proteínas recombinantes EphB4-Fc y ephrinB2-Fc respectivamente, antes del inicio del co-cultivo. Los gráficos de barras corresponden al promedio más menos desviación estándar de 3 experimentos realizados de forma independiente. La significancia estadística se determinó mediante la prueba T-student para muestras pareadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (iv) Inmunofluorescencias de agregados de células LLC-MO y Hs27 teñidos para ephrinB2 (rojo) y EphB4 (verde). Los núcleos se contrastaron con Hoechst 33258. Los paneles inferiores muestran con mayor detalle los contactos a través de ephrinB2 y EphB4 recuadrados en amarillo.

En vista de estos resultados, quisimos confirmar el papel de EphB4, expresada por las células del estroma, en la retención de las células LLC en el nicho tumoral de médula ósea. Las líneas Hs5 y Hs27a se transfectaron con siRNA específicos para esta molécula con el objeto de silenciar su expresión de forma estable. Confirmamos que la caída en la expresión era estable durante 5 días (Figura 24) y que la viabilidad de las líneas no se veía afectada (datos no mostrados).

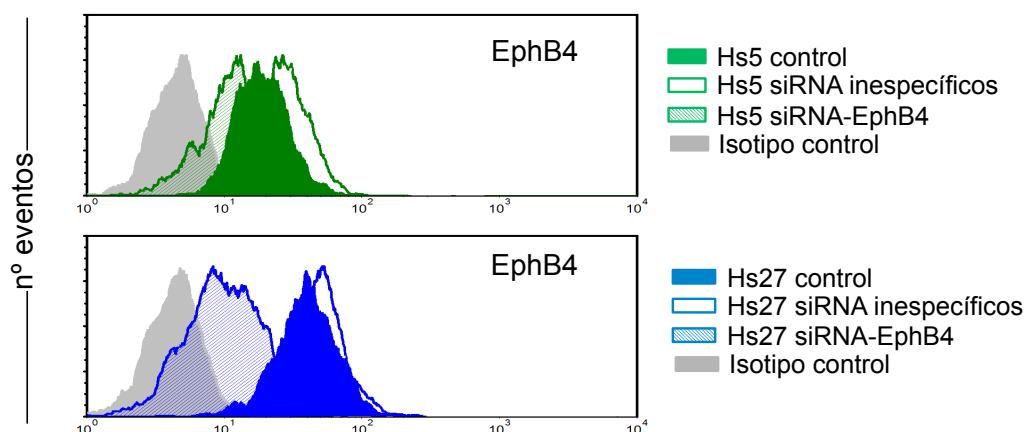


Figura 24. Silenciamiento de EphB4 en las líneas de estroma Hs5 y Hs27.

Ambas líneas de estroma humano fueron nucleofectadas con siRNA específicos contras EphB4 (Mission-siRNA Sigma) o siRNA inespecíficos como control, a una concentración de 600 nM en el volumen de reacción mediante la tecnología *Amaxa nucleofection*. El descenso en la expresión del receptor se confirmó por citometría de flujo hasta 5 días después de la transfección.

A continuación, planteamos un ensayo en placas *transwell* en el que las células de ambas líneas, en condición control o habiendo silenciado la expresión de EphB4, se sembraron sobre el filtro a una densidad no confluyente y se estimularon con TNF α para reproducir las condiciones inflamatorias de los ensayos de conjugados. Las células LLC se añadieron en el pocillo superior de la placa y transcurridas 72 horas, recuperamos aquellas que hubiesen migrado al pocillo inferior así como las retenidas en el compartimento superior mediante sucesivos lavados con PBS-EDTA. Como se muestra en la figura 25, el número de eventos no migrados era significativamente menor en los co-cultivos con

Resultados

las líneas silenciadas para EphB4, especialmente en el caso de la Hs27a. Estos datos confirmaban el papel de EphB4 en los fenómenos de adhesión y por tanto en la retención de las células LLC en la médula ósea.

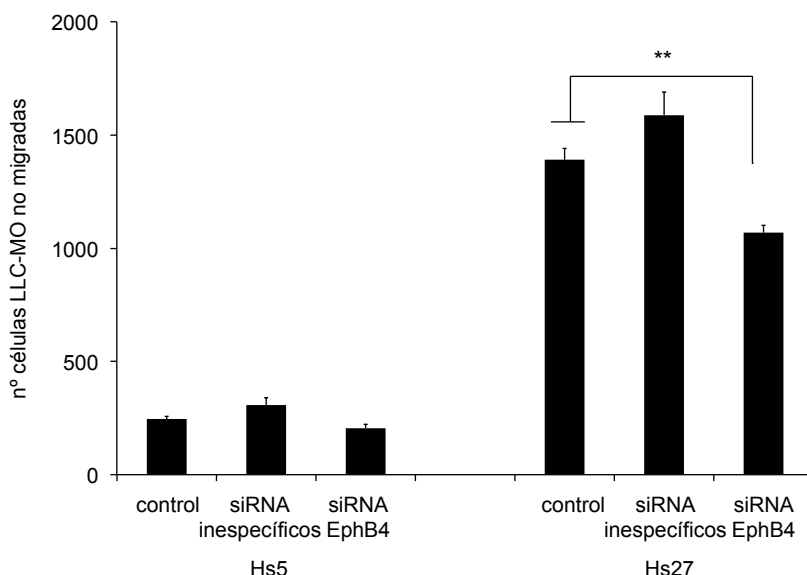


Figura 25. La expresión de EphB4 en el estroma es fundamental para la retención de las células LLC en el nicho de médula ósea. Las líneas de estroma Hs5 y Hs27, tratadas o no con siRNA específicos para EphB4, se sembraron sobre los filtros de placas tipo transwell y fueron tratadas con MMC antes de que alcanzasen la confluencia. A continuación se estimularon con TNF- α (10ng/mL) y fueron lavadas extensamente con medio de cultivo completo antes de la adición de las células LLC-MO al pocillo superior. A las 72h del inicio del co-cultivo se recuperaron tanto las células LLC-MO migradas al pocillo inferior como las no-migradas retenidas en el compartimento superior, para su recuento en el citómetro de flujo. Los gráficos de barras muestran la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes. La significación estadística de la diferencia entre las medias se valoró mediante el test T-student para muestras pareadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.4.- La señal forward a través de EphB4 induce la producción de factores solubles que sostienen la supervivencia de las células LLC.

Seguidamente, nos planteamos si la interacción entre ephrinB2-EphB4 entre las células LLC y el estroma, podría tener consecuencias sobre la supervivencia de las células LLC *in vitro* y por ello ser un posible mecanismo de resistencia a apoptosis mediada por fenómenos de adhesión.

Para analizar la importancia de los contactos directos intercelulares frente a los factores solubles secretados por las células de estroma, en la resistencia a apoptosis, sembramos co-cultivos de células LLC y células Hs5 ó Hs27 (ratio 1/20), en condiciones basales o pre-estimuladas con TNF α , en placas de fondo plano o en placas *transwell* en las que las células LLC se sembraban en el pocillo superior separadas del estroma por un filtro con un tamaño de poro de 5 μ M. Al analizar la viabilidad en las distintas condiciones (Figura 26-i) observamos que las células Hs27 sostenían significativamente la supervivencia de las células LLC en los co-cultivos directos pero en mucha menor medida cuando las LLC sólo recibían los factores solubles secretados pero no interaccionaban con las células de estroma. Por el contrario, los efectos con las células Hs5 eran de menor magnitud y no se observaban diferencias entre los distintos tipos de co-cultivo, directo o separadas por el filtro. De forma sorprendente, al contrario que ocurría con el proceso de adhesión, el tratamiento con TNF α , no incrementaba significativamente la capacidad protectora de ninguna de las líneas celulares respecto a la condición basal.

Con el objeto de confirmar el posible papel de ephrinB2 y EphB4 en la supervivencia de las LLC, repetimos los ensayos con las dos condiciones de co-cultivo (directo o en placa *transwell*) silenciando la expresión de ligando o receptor en las células LLC y en ambas líneas de estroma, respectivamente. El silenciamiento de EphB4 en los estromas o de ephrinB2 en las células LLC, contrarrestaba el efecto pro-supervivencia del co-cultivo directo con ambas líneas, aunque sólo tenía efectos estadísticamente significativos en la Hs27. Por otro lado, los tratamientos con los siRNA no tenían efectos relevantes en

Resultados

los co-cultivos separados por el sistema transwell (FIGURA 26-ii). Estos resultados, confirmaban un papel fundamental en la supervivencia, de los contactos directos a través de EphB4 y ephrinB2, entre las células de estroma y las células LLC.

Siguiendo esta hipótesis, de la misma forma a como habíamos analizado la adhesión en los ensayos de conjugados, pre-incubamos las células LLC con ephrinB2-Fc y las Hs27a con EphB4-Fc para bloquear la interacción a través de receptor y ligando, antes de sembrar ambos tipos celulares en co-cultivo y analizamos la supervivencia tras 72 horas de cultivo (Figura26-iii). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de las células LLC con el receptor recombinante impedía que el estroma rescatase su supervivencia, sin embargo, las células LLC co-cultivadas con estromas pre-tratados con el ligando en exceso, veían claramente incrementada su viabilidad respecto a las co-cultivadas con los estromas sin tratamiento.

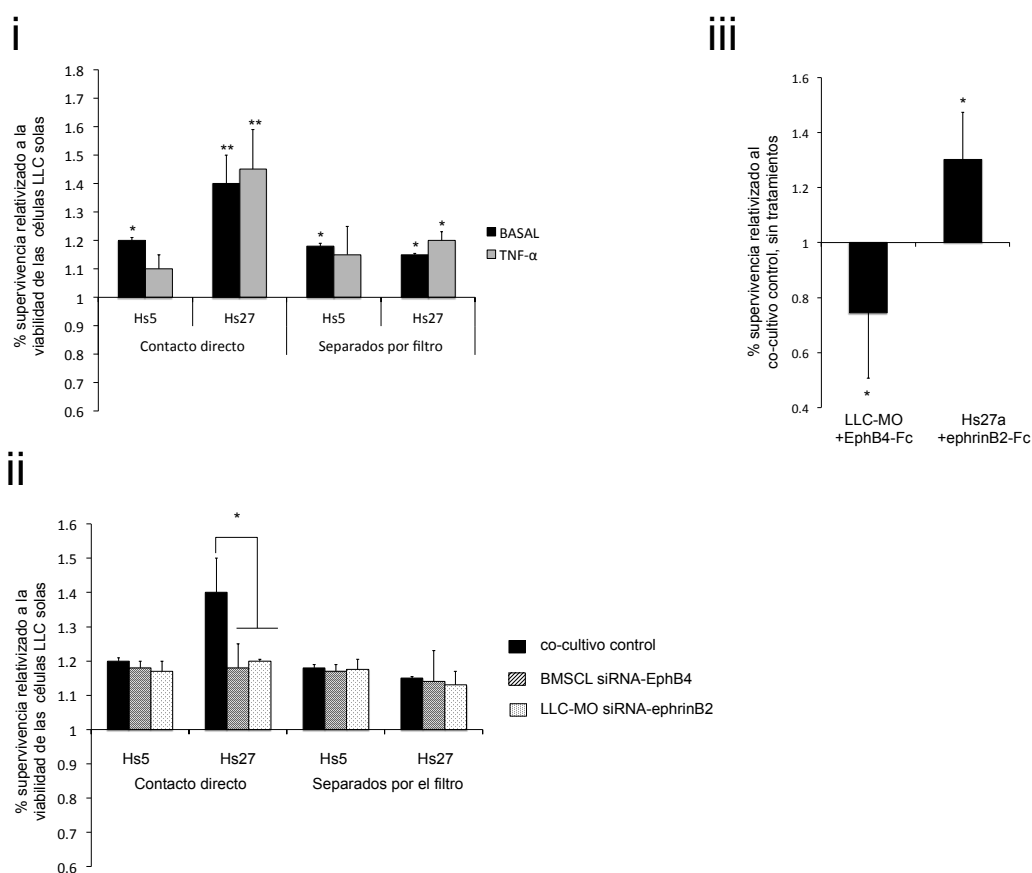


Figura 26. La interacción entre las células LLC y el estroma a través de ephrinB2 y EphB4 incrementa la supervivencia de las células tumorales in vitro. (i) Las líneas Hs5 y Hs27 se sembraron en placas de fondo plano o en el pocillo inferior de placas *transwell* y se trataron con MMC para evitar que alcanzasen la confluencia. Los estromas se trataron o no con TNF- α (10ng/mL) antes de añadir las células LLC-MO. (ii) Las células Hs27 y Hs5 en condiciones basales, así como las células LLC fueron transfectadas con siRNA contra EphB4 y ephrinB2 antes del co-cultivo en placas de fondo plano o *transwell*. (iii) Los 2 tipos celulares se pre-incubaron de forma separada con las proteínas recombinantes EphB4-Fc y ephrinB2-Fc (1 μ g/mL) antes del inicio del co-cultivo. Ambos tipos celulares se mantuvieron en cultivo en contacto directo o separados por el filtro durante 72h hasta el análisis de su supervivencia en el citómetro de flujo como en experimentos anteriores. La significancia estadística de las distintas condiciones de cultivo se analizó mediante el test T-student para muestras pareadas. Representamos las medias y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Por tanto, podíamos concluir que la inducción de la señal *forward* a través de EphB4 en el estroma, además de incrementar la capacidad de adhesión con las células LLC, sostenía su supervivencia mediada por contactos intercelulares. Sin embargo, nos planteamos si dichos contactos eran responsables directamente del incremento de la viabilidad o bien si actuaban de forma indirecta desencadenando la liberación de factores solubles, por parte de uno o de los dos tipos celulares, que favoreciesen la supervivencia de las células LLC. Para comprobarlo, decidimos analizar los efectos sobre la supervivencia de los medios condicionados resultantes de los co-cultivos. Sembramos la línea Hs27, que había demostrado la mayor capacidad de incrementar la viabilidad de las células LLC, en condición control o habiendo silenciado en ellas la expresión de EphB4 mediante siRNA. Sobre estos cultivos de estroma, añadimos células LLC en un ratio de 1/20 permitiendo la adhesión entre ambos tipos celulares durante 2 horas. En ese punto, retirábamos las células no adheridas y manteníamos el co-cultivo con las células LLC fuertemente adheridas al estroma, durante 72 horas. Así mismo, sembramos cultivos de células Hs27 y LLC por separado como control. Recuperamos el medio condicionado por las distintas condiciones de cultivo y establecimos nuevos cultivos de células LLC a los que añadimos estos medios para comprobar si los factores solubles por sí mismos sostenían su

viabilidad. En la Figura 27-i se muestra el análisis de la viabilidad tras 3 días de cultivo. Observamos que el medio recuperado de los cultivos de las células Hs27 solas, incrementaba ligeramente la supervivencia de las células LLC, sin embargo, las diferencias eran significativamente mayores si el medio empleado procedía de co-cultivos de células LLC y Hs27a en condición control, pero no si habíamos silenciado la expresión de EphB4 en las células de la línea. El medio procedente de los cultivos de células LLC solas no modificaba la supervivencia. Para confirmar el papel de ephrinB2 en el contacto con las BM-MSC, las células Hs27a se cultivaron en presencia o no de la proteína recombinante ephrinB2-Fc (1ug/mL) añadida al medio en su forma soluble durante 72 horas. Del mismo modo a como habíamos procedido con los co-cultivos, se recuperó el medio condicionado por estos cultivos, para analizar el efecto de los factores solubles sobre la viabilidad de las células LLC. La supervivencia de las células LLC se veía claramente incrementada por la adición del medio resultante del cultivo de la Hs27 pre-tratada con ephrinB2-Fc (Figura 27-ii).

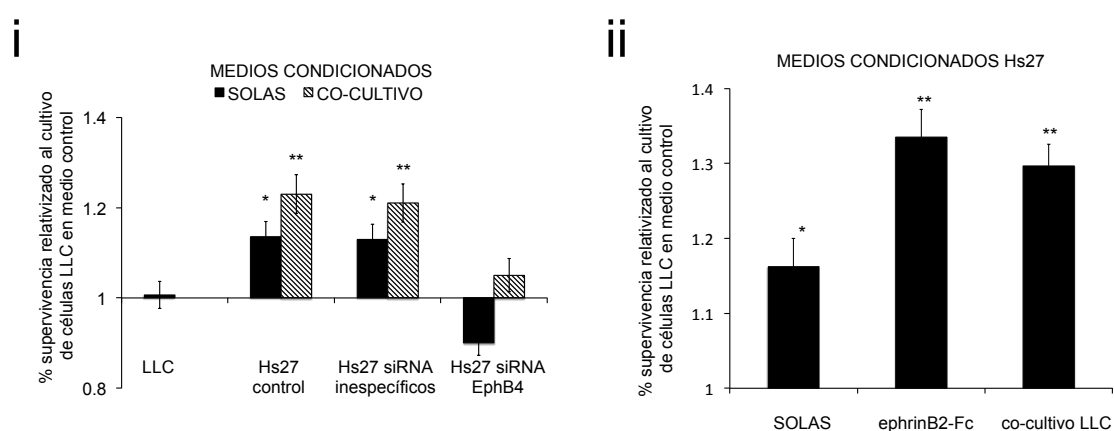


Figura 27. Análisis del efecto sobre la supervivencia de las LLC de los medios condicionados obtenidos de cultivos de Hs27 co-cultivadas con células LLC o estimuladas con ephrinB2-Fc. (i) Las células Hs27, en condición control o silenciadas para EphB4, se cultivaron con células LLC fuertemente adheridas durante 72h. Mantuvimos en cultivo células Hs27 solas como control. El medio resultante de estos co-cultivos se añadió a nuevos cultivos de células LLC para analizar el efecto sobre su supervivencia a 72h. **(ii)** Las células Hs27 se trataron con la proteína ephrinB2-Fc durante 72h. Recuperamos el medio condicionado por estos cultivos y fue añadido a cultivos de células LLC solas. Ambos gráficos de barras muestran el resultado como el promedio de 3 experimentos realizados de manera independiente. El análisis de la supervivencia se realizó por citometría de flujo como en ensayos previos. La significancia estadística de las distintas condiciones, relativizadas al cultivo en medio control, se analizó mediante el test T-student para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Por otro lado, el análisis de la expresión de ephrinB2 tanto en las primeras células LLC recuperadas, es decir, no adheridas al estroma, como en las adheridas, separadas del estroma mediante incubación con EDTA 5mM, confirmó el resultado de los ensayos de conjugados, ya que las células LLC recogidas en la fracción del cultivo no adherida presentaban una expresión intermedia de ephrinB2 y aquellas fuertemente adheridas se correspondían con la población ephrinB2^{high} (Figura 28).

En definitiva, todos estos resultados confirmaban que la inducción de la señal forward en las células de estroma, resultante de interacción entre ephrinB2 y EphB4, tenía como consecuencia un aumento de la secreción de factores solubles por parte de las células de estroma, que colaboran en sostener la viabilidad de las células LLC.

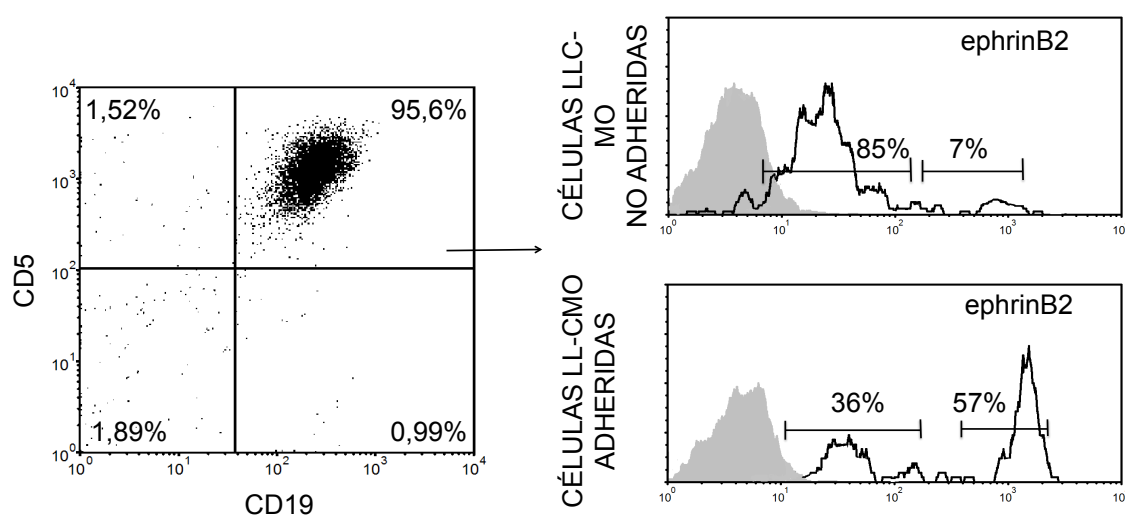


Figura 28. Análisis de la expresión de ephrinB2 en las células LLC co-cultivadas con las Hs27. A la izquierda se muestra un dot-plot de la tinción CD19 CD5 identificando al 95,6% de las células de pequeño tamaño de nuestros cultivos como células LLC. Los histogramas de la derecha muestran las 2 poblaciones diferenciables en base a la expresión de ephrinB2 en las LLC que no se encontraban adheridas a las células mesenquimales y en aquellas con mayor capacidad de adhesión.

3.5.- La señalización forward a través de EphB4 inducida por las células ephrinB2^{high} modifica las propiedades del estroma generando un microambiente que proporciona resistencia frente a los tratamientos con fármacos.

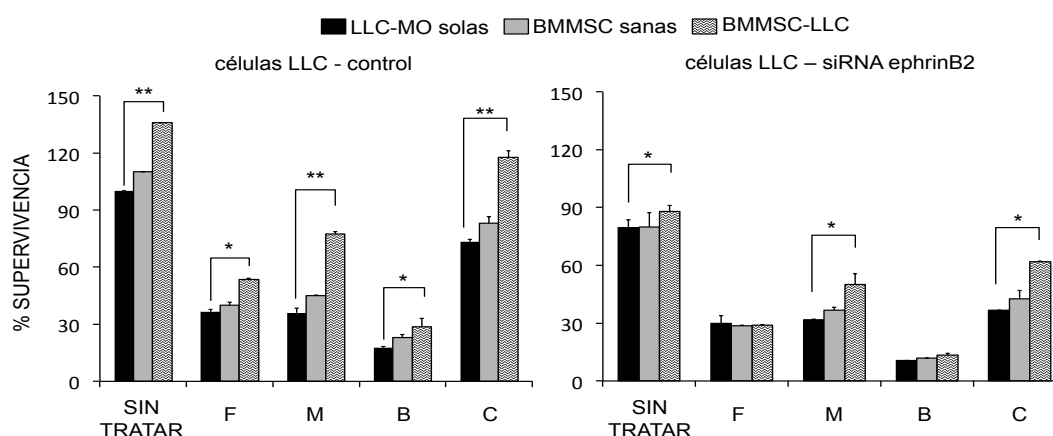
En vista de estos resultados, nos planteamos si los mecanismos descritos anteriormente pudiesen contribuir a generar un nicho tumoral capaz de proteger a las células LLC de la apoptosis inducida por algunos de los tratamientos farmacológicos más empleados contra esta enfermedad.

Decidimos evaluar la capacidad protectora de las BMMSC derivadas de los aspirados de médula ósea de pacientes LLC (BMMSC-LLC), previa depleción de las células CD45⁺, frente a la de las BMSC obtenidas en los cultivos de muestras de donantes sanos (BMMSC sanas). Para confirmar el papel de ephrinB2, los co-cultivos con ambas BMSC se establecieron con células LLC en condición control y tratadas con siRNA específicos contra este ligando. En la figura 29-i se muestran los porcentajes de supervivencia de estos co-cultivos en presencia o no de Fludarabina (1µM), Mafosfamida (5µM), Bendamustina (15µM) o Chlorambucil (25µM) transcurridas 72 horas. En primer lugar, confirmamos que la viabilidad de las células LLC era sostenida preferentemente por BMMSC-LLC pero no por aquellas derivadas de donantes sanos, en la condición control y con los 4 fármacos utilizados. Sin embargo, este efecto se veía claramente impedido en las células en las que se había silenciado la expresión de ephrinB2, particularmente en los tratamientos con Fludarabina y Bendamustina, confirmando el papel de esta molécula en la resistencia a fármacos mediada por contactos con las células de estroma.

Para comprobar si los efectos observados en los co-cultivos con estroma derivado de pacientes pudiesen deberse a características inducidas por las células tumorales, BMMSC derivadas de individuos sanos fueron pre-cultivadas durante una semana con linfocitos LLC enriquecidos en la subpoblación ephrinB2^{high} o estimuladas por ephrinB2-Fc. Seguidamente, recuperamos las BMSC liberando previamente los linfocitos adheridos mediante sucesivos

lavados con PBS-EDTA 5mM. Se establecieron nuevos co-cultivos con estas BMMSC sanas pre-cultivadas con linfocitos LLC o con la proteína recombinante y sin estimular como condición control, analizándose la viabilidad a las 72 horas (Figura 29-ii). De forma interesante, las BMSC sanas pre-cultivadas con linfocitos LLC, y en menor magnitud aquellas estimuladas con ephrinB2-Fc, conseguían sostener la supervivencia de las células LLC en especial frente a los tratamientos con fármacos. Esto confirmaba, que las propias células tumorales eran capaces de inducir la dependencia de la señalización inducida por ephrinB2 en las BMSC, modificando el microambiente en su favor.

i



ii

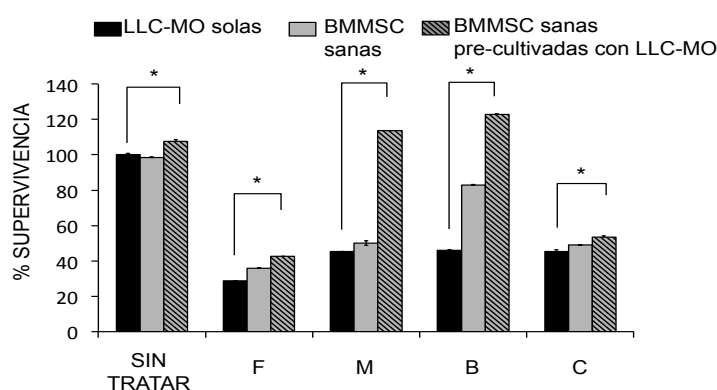


Figura 29. Las células LLC modifican las propiedades de las BMMSC generando un microambiente que promueve la resistencia a la apoptosis mediada por fármacos. (i) BMMSC derivadas del cultivo de muestras de pacientes LLC y de donantes sanos se cultivaron a una densidad no confluyente con células LLC-MO en presencia de Fludarabina ($1\mu\text{M}$), Mafosfamida ($5\mu\text{M}$), Bendamustina ($15\mu\text{M}$) o Chlorambucil ($25\mu\text{M}$), según se indica, durante 72h. Las células LLC-MO se añadieron en condición control o tratadas con siRNA-ephrinB2. (ii) Las BMMSC obtenidas de donantes sanos se pre-cultivaron con células LLC durante 7 días, antes de sembrar co-cultivos con células LLC frescas en presencia de los distintos fármacos. BMMSC sanas sin pre-tratar se co-cultivaron como condición control. Analizamos la viabilidad por citometría de flujo y representamos los efectos de cada tratamiento en las distintas condiciones, considerando el 100% la viabilidad de las células LLC-control cultivadas solas. Los gráficos muestran el promedio y desviación estándar de los experimentos realizados con 4 muestras LLC. La significancia estadística de las diferencias entre las medias se analizó mediante el test T-student para muestras pareadas $*p<0,05$; $**p<0,01$.

4.- PAPEL DE LAS INTERACCIONES Eph/ephrin EN LA SUPERVIVENCIA/RESISTENCIA FÁRMACOS, A TRAVÉS DE OTROS MECANISMOS DE CRECIENTE INTERÉS EN LA ENFERMEDAD, ESPECIALMENTE LA FAMILIA BAFF/APRIL, LA SEÑALIZACIÓN VÍA INTEGRINAS Y BCR/CD40.

Los resultados del apartado anterior habían demostrado la importancia de la señalización bidireccional resultante de la interacción ephrinB2-EphB4 en la supervivencia de las células LLC *in vitro* tanto en los contactos homotípicos como en aquellos con las células del estroma de médula ósea. Por otro lado, el co-cultivo con células de estroma recuperaba el fenotipo ephrinB2 observado en las células LLC recién obtenidas a partir de los aspirados de médula ósea, que desaparecía en el cultivo de las células solas. Estos datos sugerían que la expresión de ephrinB2 en las células tumorales, y en consecuencia la supervivencia de las mismas, era dependiente de distintos estímulos procedentes del microambiente.

Son muchas las rutas de señalización descritas en el contexto del microambiente de médula ósea en la LLC. Nos planteamos si los efectos observados en relación a la señalización Eph-ephrin pudiesen estar involucrando otras rutas conocidas de supervivencia.

4.1.- La expresión de ephrinB2 en las LLC-MO y la supervivencia de las mismas es dependiente de la interacción con VCAM-1, BAFF y APRIL.

En base a las características inmunofenotípicas observadas en las células LLC de médula ósea y con el objeto de identificar los estímulos que podían sostener la expresión de ephrinB2 y en consecuencia, la viabilidad de las células tumorales, diseñamos un experimento en el que las células obtenidas tanto de sangre periférica como de médula ósea de pacientes LLC, se cultivaron sobre componentes de la matriz extracelular como fibronectina, sobre los ligandos de integrinas ICAM-1 ó VCAM-1 inmovilizados sobre la superficie de cultivo o bien añadiendo al medio en forma soluble

Resultados

quimioquinas como CXCL12 o los ligandos BAFF y APRIL, a las concentraciones indicadas, por ser algunas de las moléculas más expresadas por las BMSC. Así mismo, estimulamos las células LLC a través del BCR, al señalizarlas con anti-IgM y añadimos moléculas de CD40L pre-agregadas para mimetizar las posibles interacciones con los linfocitos T.

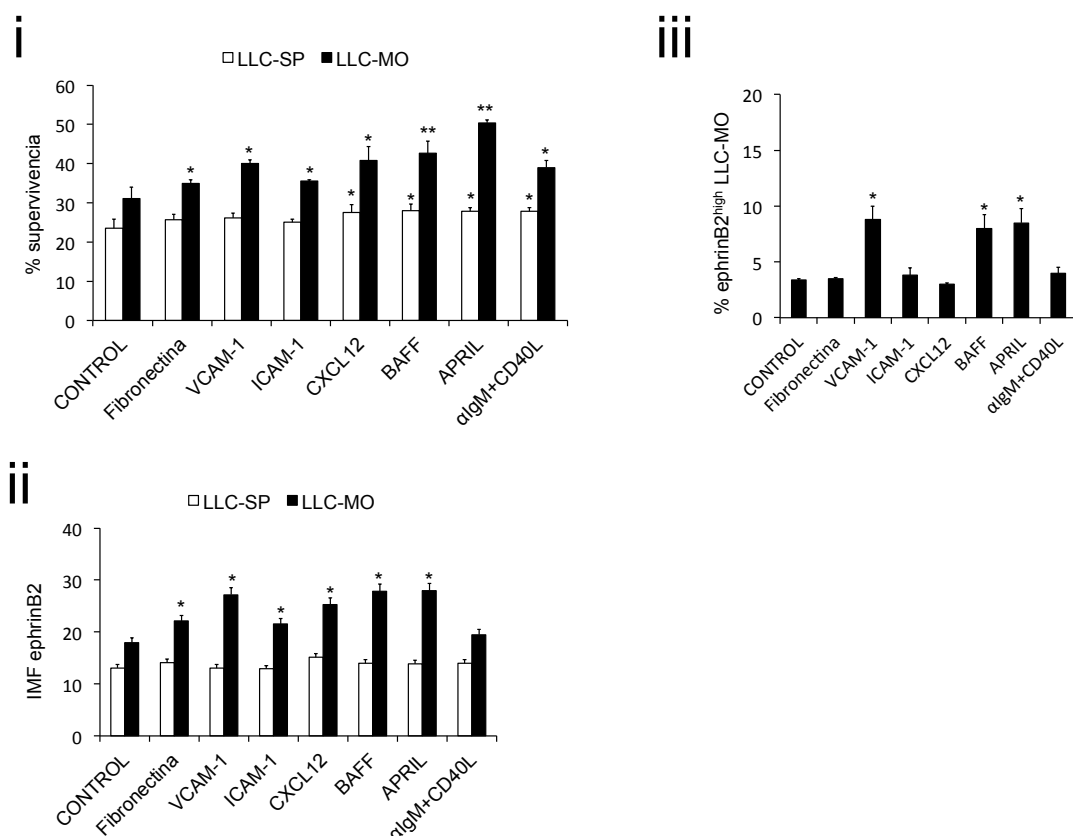


Figura 30. Distintos estímulos procedentes del microambiente sostienen la supervivencia de las LLC y la expresión de ephrinB2. (i) Células LLC de SP y MO se cultivaron en presencia de distintos estímulos durante 72h hasta el análisis de la viabilidad. (ii) IMF de ephrinB2 en todas las condiciones de cultivo. (iii) % de células ephrinB2^{high} en las LLC-MO cultivadas con los diferentes estímulos. La diferencia estadísticamente significativa de los resultados se determinó mediante el test-T student para muestras pareadas *p<0,05; **p<0,01.

El análisis de la viabilidad a 72 horas de cultivo (Figura 30-i) mostró que las células procedentes de ambos compartimentos celulares, veían incrementada su viabilidad en presencia de BAFF, APRIL y CXCL12 pero solo las células obtenidas de aspirados de médula ósea respondían al cultivo sobre

los ligandos de integrinas o sobre fibronectina. Por otro lado, los estímulos inducían distintos grados de recuperación de la expresión de ephrinB2 en las células de médula ósea, aunque no en las de sangre periférica, respecto a su caída en el cultivo control, de forma proporcional al incremento en la supervivencia (Figura 30-ii). Esto sugería que esta molécula estaba implicada en mecanismos de supervivencia dentro del microambiente medular que perdían relevancia una vez que las células LLC salían de este. De manera interesante únicamente observábamos la existencia de la subpoblación ephrinB2^{high} en los cultivos sobre VCAM-1 o en presencia de los ligandos BAFF y APRIL (Figura 30-iii), lo que apoyaba nuestra idea de que esta población, en contraposición a la mayoritaria ephrinB2^{int}, era más dependiente del contacto con otros tipos celulares dentro del microambiente que de las interacciones homotípicas entre las propias células.

Por otro lado, también la estimulación conjunta con anti-IgM y CD40L incrementaba la viabilidad de las células LLC extraídas de sangre periférica y médula ósea, apuntando a la importancia de la interacción de las LLC con otros tipos celulares distintos de BMMSC. Sin embargo, estos estímulos no modulaban la expresión de ephrinB2.

4.2.- El papel de VCAM-1 en la supervivencia de las LLC-MO es independiente de la expresión de EphB4.

La supervivencia de las células LLC mediada por la interacción entre la integrina $\alpha 4$ y su ligando preferente VCAM-1 es una de las rutas más estudiadas dentro de la LLC y con una mayor proyección en la clínica (Vincent y cols., 1996, Brachtl y cols., 2014). Nuestros resultados previos habían mostrado la sobre expresión de $\alpha 4$ en las células ephrinB2^{high} así como el papel de la proteína recombinante VCAM-1 en el mantenimiento de la expresión de ephrinB2 y en la supervivencia de las LLC-MO. A continuación, quisimos determinar si existía una relación entre este ligando y la supervivencia mediada por el contacto con BMMSC que habíamos observado en nuestros ensayos.

Analizamos la expresión de VCAM-1 en la superficie de las BMMSC derivadas de muestras de médula ósea de pacientes LLC y también en las líneas Hs5 y Hs27, en condiciones basales o estimuladas con TNF- α . De acuerdo con lo descrito por otros autores (Amigo-Jimenez y cols., 2015) observamos que, al contrario que las líneas celulares, las células de estroma primario sí expresaban el ligando en membrana en condiciones basales. Más aún, en condiciones inflamatorias se inducía significativamente la expresión de VCAM-1 en la Hs27 y se incrementaba ligeramente en las BMMSC de pacientes (Figura 31-i). La Hs5 se caracterizó por ausencia de expresión en ambas condiciones.

Por otro lado, dado que rVCAM-1 inmovilizada en placa inducía la recuperación de la población ephrinB2^{high}, nos planteamos si las células LLC también podrían inducir un cambio fenotípico en las BMMSC. De manera interesante, el co-cultivo también incrementaba la expresión de VCAM-1 en las BMMSC (Figura 31-ii).

En vista de estos resultados, nos preguntamos si tanto el estímulo con TNF- α como el co-cultivo pudiesen inducir cambios en la expresión de EphB4 en el estroma relacionados con las modulaciones de VCAM-1. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que ninguno de los tratamientos modulaba la expresión de EphB4.

En conjunto, podíamos deducir que la interacción con VCAM-1 sí juega un papel determinante, probablemente en los procesos de adhesión, en el mantenimiento de las LLC dentro del microambiente de médula ósea. Sin embargo, esta ruta sería independiente de la supervivencia sostenida por señalización EphB4-ephrinB2.

4.3.- La estimulación de las LLC-MO a través del BCR y de CD40 induce la proliferación de una sub-población con expresión intermedia de ephrinB2.

Nuestros resultados habían mostrado que la estimulación con α IgM y CD40L sostenía parcialmente la supervivencia de las LLC-MO. Sin embargo, trabajos recientes han descrito la implicación de estas moléculas en mecanismos de proliferación dentro del nicho de médula ósea (Purroy y cols., 2015). Quisimos comprobar esta hipótesis en nuestro sistema de co-cultivo que ya había demostrado proteger a las células LLC-MO frente a mecanismos de apoptosis.

Para el análisis de la proliferación las células LLC se incubaron con CFSE (0,5 μ M) antes de añadirlas a los cultivos en presencia de α IgM, CD40L y BMMSC por separado o conjuntamente. En la figura 32-i se muestra el porcentaje de células proliferativas determinadas en base a la dilución de la intensidad de CFSE después de 5 días de cultivo. Observamos que ni α IgM, ni CD40L por separado inducían cambios en el porcentaje de células en división, pero sí cuando se añadían simultáneamente. Más aún, las BMMSC por sí mismas tampoco tenían efectos significativos, pero sí potenciaban los efectos de α IgM y CD40L. Al analizar la expresión de ephrinB2 en estos

ensayos comprobamos que, de acuerdo a los datos de expresión de Ki67 previamente mostrados, las células proliferativas se encontraban restringidas dentro de las células ephrinB2^{int} (Figura 32-ii).

Por tanto, confirmábamos que las células con una expresión elevada de ephrinB2 conformaban una población quiescente independiente de los efectos de la señalización a través del BCR y CD40.

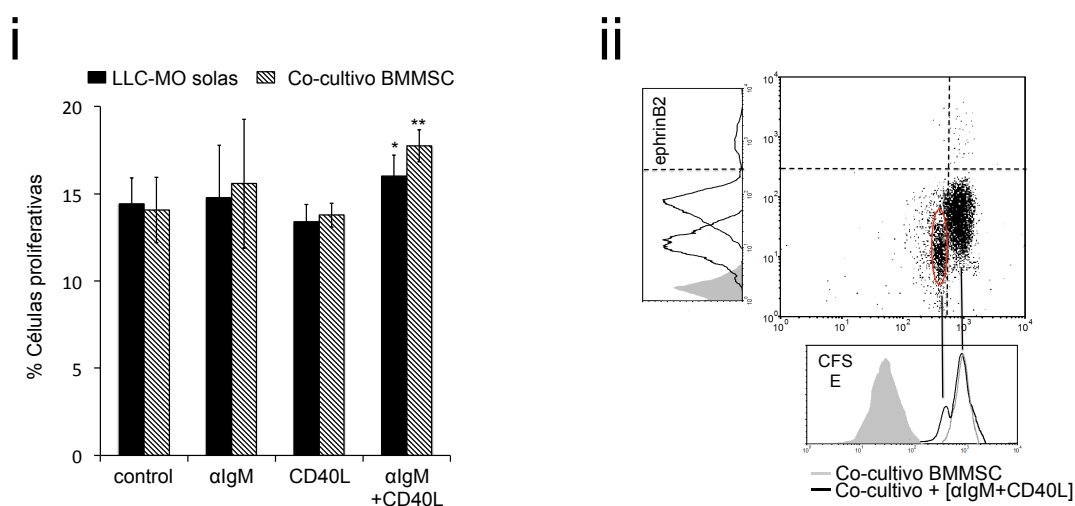


Figura 32. La señalización inducida por αIgM y CD40L incrementa la proliferación de una subpoblación de células LLC ephrinB2^{int}. (i) Células LLC-MO se incubaron con CFSE (0,5μM) para el análisis in vitro de la proliferación en presencia de αIgM (0,5μg/mL) inmovilizado sobre la superficie de cultivo o moléculas de CD40L pre-agregadas mediante αHistidina () añadidas de forma soluble al medio de cultivo. Las células LLC-MO se cultivaron solas con los distintos estímulos o en co-cultivo con BMMSC autólogas. El gráfico de barras indica el promedio de células proliferativas de 3 experimentos realizados de forma independiente. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05; **p<0,001. (ii) Dot-plot e histogramas representativos del análisis de la expresión de ephrinB2 frente a la intensidad de CFSE en las LLC-MO de los ensayos de proliferación. El histograma de la izquierda muestra la IMF de ephrinB2 en las células que hubiesen o no entrado en división. El histograma bajo el dot-plot muestra los diferentes picos de intensidad de CFSE detectados en las LLC-MO co-cultivadas con BMMSC en presencia o no de los estímulos.

4.4.- EphrinB2 sostiene la ruta autocrina de supervivencia mediada por BAFF/APRIL en las células LLC de médula ósea.

La importancia de BAFF y APRIL en la LLC ha sido descrito en múltiples trabajos (Nishio y cols., 2005, Endo y cols., 2007). Dado que nuestros resultados mostraban que BAFF y APRIL eran los estímulos que en mayor magnitud incrementaban la viabilidad de las células LLC obtenidas de ambos compartimentos tisulares, seleccionamos esta familia de moléculas para investigar un posible mecanismo de supervivencia desencadenado por la interacción Eph-ephrin entre las propias células LLC. En primer lugar, quisimos confirmar la expresión de los receptores BAFF-R, TACI y BCMA así como de los ligandos BAFF y APRIL en nuestras muestras obtenidas de aspirados de médula ósea de pacientes LLC. De acuerdo con lo descrito por otros autores (Novak y cols., 2002) en todos los pacientes, detectamos la expresión de BAFF-R en la mayoría de la población LLC y la de TACI en un porcentaje menor y variable de células tumorales, mientras que la expresión de BCMA era prácticamente inexistente en las muestras analizadas. Confirmamos, además de la expresión intracitoplásmica de BAFF y APRIL, la presencia de ambos ligandos en la membrana de las células LLC, como habían mostrado los trabajos de Kern y cols., 2004, quienes sugirieron por primera vez la existencia de una ruta autocrina de supervivencia mediada por BAFF y APRIL en esta enfermedad. La figura 33 muestra la IMF de cada molécula estudiada, en un paciente representativo.

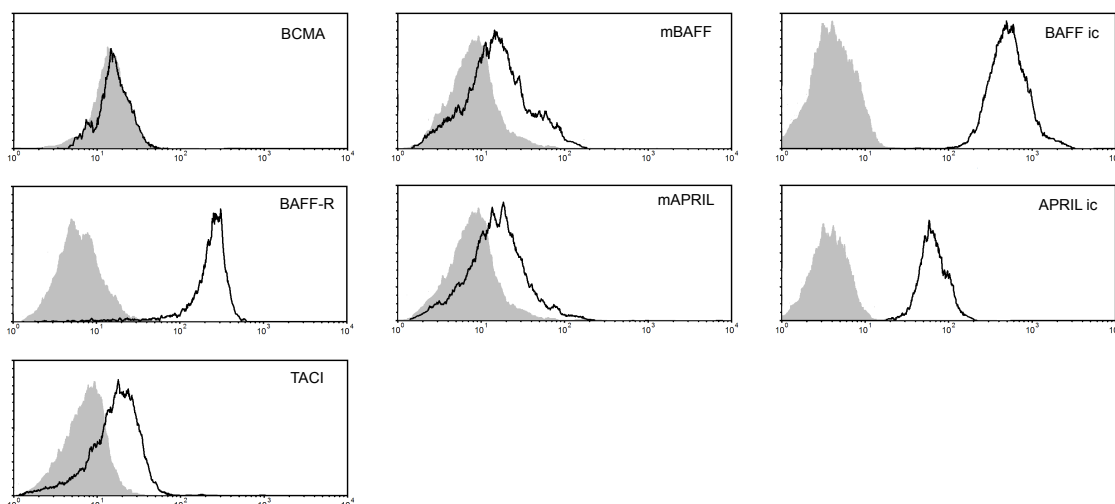
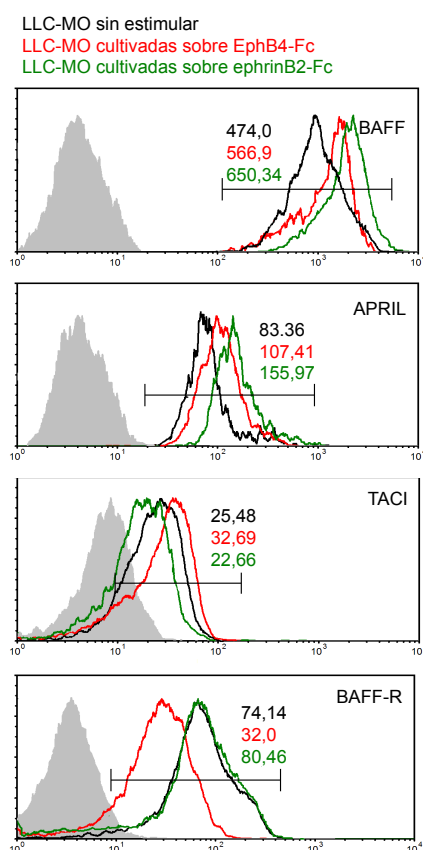


Figura 33. Análisis de la expresión de los receptores y ligandos de las moléculas de la familia BAFF en células LLC-MO. La figura muestra ejemplos de histogramas resultantes del análisis por citometría de flujo de la IMF de los receptores BCMA, BAFF-R y TACI así como de los ligandos BAFF y APRIL en células CD19⁺ CD5⁺ recién extraídas de aspirados de médula ósea de pacientes LLC. Para las tinciones en superficie, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados directamente a fluorocromos, mientras que para la determinación de la expresión intracelular, las suspensiones de fijaron con una solución comercial conteniendo paraformaldehído y se permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos αBAFF y αAPRIL conjugados a PE. El histograma gris relleno corresponde a la IMF del isotipo control para cada caso.

Se ha descrito que distintas señales del microambiente (IgM, CD40L...) son capaces de modular la expresión de los receptores de BAFF y APRIL. En vista de los anteriores resultados, nuestra hipótesis se dirigió hacia la posibilidad de que, bien la activación de la señal *forward* o de la señal *reverse*, pudiese desencadenar una mayor liberación de BAFF o APRIL por las células LLC. A continuación, analizamos si el incremento de supervivencia observado al inducir la señal *reverse* y, en menor medida, la señal *forward*, sembrando las células LLC sobre las proteínas recombinantes inmovilizadas sobre la superficie de cultivo, iba acompañado de cambios en la expresión de estos ligandos y de sus receptores BAFF-R y TACI. Determinamos la intensidad de expresión de estas moléculas mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 34-i, ephrinB2-Fc inmovilizada en placa y, en menor medida, EphB4-Fc, inducían un incremento en la expresión de BAFF y APRIL intracitoplásmicos en comparación con los niveles detectados en las células sin

estimular o en la condición control, cultivadas sobre fragmentos de Fc humanos, lo que podía corresponderse con una mayor secreción de estos factores. Sin embargo, sólo la inducción de la señal *reverse*, mediante el cultivo sobre EphB4-Fc, resultaba en cambios significativos en la expresión de los receptores, ya que sorprendentemente observamos una disminución en la expresión de BAFF-R acompañada de incremento en la expresión de TACI. Más aún, al analizar la expresión de BAFF-R y TACI en relación con la de ephrinB2 en células LLC en condiciones control, confirmamos que el primero se encontraba disminuido mientras que el segundo se sobre-expresaba en la sub-población ephrinB2^{high}, en relación a la IMF en la población de células LLC mayoritaria (Figura 34-ii).

i



ii

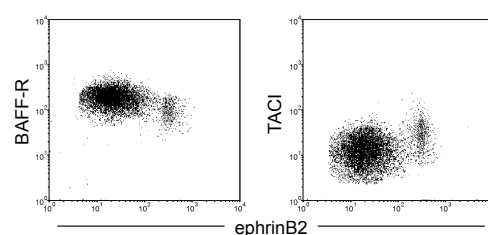


Figura 34. La señalización forward a través de EphB4 y reverse a través de ephrinB2, modula la expresión de BAFF-R, TACI, BAFF y APRIL en células LLC-MO. (i) Células LLC-MO se cultivaron sobre las proteínas recombinantes EphB4-Fc (perfil vacío rojo) o ephrinB2-Fc (perfil vacío verde) o sobre fragmentos hFc (histograma negro) como condición control, durante 72h hasta el análisis en el citómetro de flujo de la expresión de BAFF, APRIL, TACI y BAFF-R. El histograma gris relleno corresponde a la intensidad de fluorescencia del isotipo control. Mostramos las IMF sobre cada histograma de una muestra representativa. (ii) Análisis de la expresión de los receptores BAFF-R y TACI frente a la expresión de ephrinB2 en células LLC-MO recién obtenidas de los aspirados. Se muestra un dot-plot representativo de los resultados.

Seguidamente, quisimos confirmar si la señalización *forward* y/o *reverse* desencadenaban una mayor secreción de BAFF y/o APRIL al medio de cultivo y en consecuencia incrementaban la capacidad de sostener la supervivencia del mismo. Utilizamos los receptores recombinantes BAFF-R (rhBAFF-R) y TACI (rh-TACI), y los añadimos de forma soluble a los cultivos de células LLC en los que habíamos inducido la señalización a través de Eph-ephrin B durante 48 horas, con el objeto de secuestrar los posibles ligandos secretados al medio e impedir su unión con el receptor correspondiente. Analizamos la supervivencia mediante citometría de flujo. En la Figura 35 se muestran los porcentajes de viabilidad de las células LLC 24 horas después de añadir los tratamientos de bloqueo, relativizados al cultivo control en el que las células se cultivaban sobre fragmentos Fc humanos. Observamos que ninguno de los receptores recombinantes añadidos sobre el cultivo control disminuía significativamente la viabilidad de las células cultivadas. Por el contrario, la adición de rhBAFF-R y sobre todo la de rhTACI, contrarrestaba los efectos pro-supervivencia de las proteínas EphB4-Fc y ephrinB2-Fc inmovilizadas en placa, disminuyendo la viabilidad en una media de un 15%.

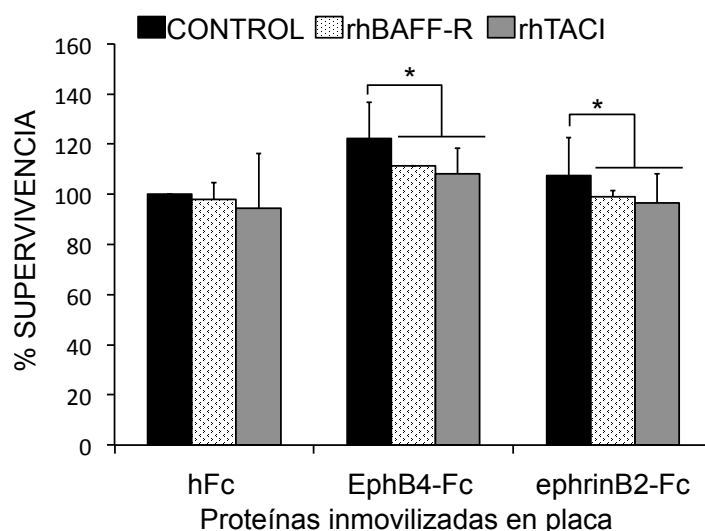


Figura 35. La señalización forward induce una mayor secreción de BAFF y/o APRIL por las células LLC, cuyos efectos son bloqueados por la adición de los receptores recombinantes al medio de cultivo. Células LLC-MO se cultivaron sobre EphB4-Fc, ephrinB2-Fc o fragmentos hFc (0,5µg/mL) como condición control durante 48h. En ese punto se añadieron al medio de cultivo las formas recombinantes de los receptores BAFF-R o TACI (0,2µg/mL) durante 24h más hasta el análisis de la apoptosis por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de viabilidad de las células LLC-MO en las condiciones indicadas, considerando el 100% la supervivencia de las células control cultivadas sobre fragmentos hFc. Representamos la media y desviación estándar de 4 ensayos independientes. La significancia estadística de los resultados se valoró mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05.

En vista de estos resultados, nos preguntamos si, además de incrementar la secreción de los factores solubles, la señalización a través de Eph-ephrin B modulaba la capacidad de las células LLC para unir los ligandos BAFF y/o APRIL, incrementando su supervivencia. Por ello, añadimos de forma exógena al cultivo las proteínas rhBAFF y rhAPRIL a una concentración previamente ensayada de 0,2µg/mL en forma soluble, por separado o conjuntamente para evaluar además si existía un efecto sinérgico de ambas moléculas. Analizamos el efecto a 72 horas sobre las células LLC cultivadas sobre EphB4-Fc o ephrinB2-Fc o sobre fragmentos Fc humanos como condición control. En la Figura 36-i representamos el ratio de supervivencia de las células LLC al normalizar el porcentaje de células vivas obtenido en cada tratamiento frente al porcentaje en el cultivo control. Observamos que ambos

ligandos, por sí mismos, pero en especial APRIL, rescataban parcialmente la viabilidad de las células cultivadas. Sin embargo, la magnitud del efecto se incrementaba considerablemente en las células en las que habíamos inducido la señal *reverse*, en las que observamos como el tratamiento conjunto con rhBAFF y rhAPRIL llegaba a aumentar hasta 3 veces la supervivencia respecto a la condición control. De forma significativa, la señalización *forward* a través de EphB4 en las células LLC no modificaba la respuesta de las células LLC frente a los tratamientos con los ligandos, lo que concordaba con la ausencia de cambios en la expresión de los receptores BAFF-R y TACI en las células cultivadas sobre ephrinB2-Fc, observada previamente.

A continuación, quisimos estudiar si esta ruta pudiese ser relevante también en la resistencia de las células LLC frente a la apoptosis inducida por fármacos. Establecimos cultivos sobre EphB4-Fc o sobre fragmentos Fc humanos, en presencia o ausencia de rhBAFF y/o rhAPRIL a los que añadimos algunos de los fármacos más utilizados en el tratamientos de la LLC: Fludarabina (1 μ M), Mafosfamida (5 μ M), Bendamustina (15 μ M) o Chlorambucil (25 μ M). En la Figura 36-ii, se muestra como la inducción de la señal *reverse* protegía sensiblemente a las células LLC de la citotoxicidad de los fármacos, e incrementaba la protección proporcionada por BAFF y APRIL.

Todos estos resultados apuntaban a una posible ruta dependiente de la señal *reverse* a través de ephrinB2 y mediada por la interacción de BAFF y APRIL con TACI que controlase la supervivencia de las células LLC.

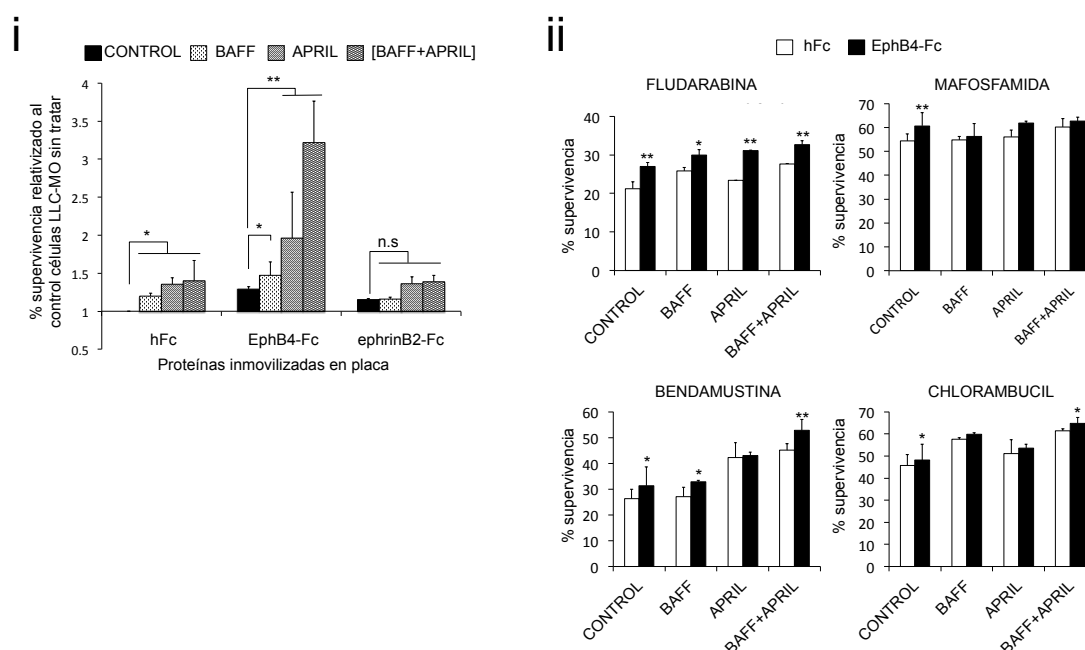


Figura 36. La activación de la señal ephrinB2-reverse en las células LLC incrementa su afinidad por los ligandos BAFF/APRIL potenciando su supervivencia. (i) Las células LLC-MO se cultivaron sobre las proteínas recombinantes EphB4-Fc o ephrinB2-Fc o sobre fragmentos hFc (0,5µg/mL) como control. Las formas recombinantes de los ligandos BAFF y/o APRIL se añadieron al medio en los casos indicados a una concentración de 0,2µg/mL. Representamos el análisis de la viabilidad a 72h de cada una de las condiciones, relativizada al control de células LLC-MO cultivadas sobre fragmentos hFc sin señalizar mediante Eph/ephrin. (ii) Células LLC-MO cultivadas sobre fragmentos hFc o sobre EphB4-Fc del mismo modo que en (i), en presencia de Fludarabina (1µM), Mafosfamida (5µM), Bendamustina (15µM) o Chlorambucil (25µM). Los fármacos se mantuvieron en el medio de cultivo durante todo el experimento hasta el análisis de la viabilidad en el citómetro. Los gráficos de barras muestran la media y desviación típica de los experimentos realizados en muestras de 4 pacientes distintos. La significancia estadística de los resultados se valoró mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05; **p<0,01.

4.5.- La inducción de la señal *forward* en BMSC activa una ruta paracrina de supervivencia que sostiene la viabilidad de las células LLC-MO.

Habiendo confirmado la implicación de BAFF y APRIL en el mecanismo de supervivencia mediado por interacciones homotípicas entre las células LLC a través de Eph-ephrin B, nos planteamos si pudiese estar teniendo lugar un fenómeno similar en la interacción con las células del estroma de médula ósea.

En primer lugar, quisimos confirmar la expresión de ambos ligandos en las líneas de estroma Hs5 y Hs27. Como habíamos observado al caracterizar el fenotipo del estroma derivado de nuestros cultivos de aspirados de médula ósea de pacientes de LLC, ambas líneas expresaban BAFF y APRIL a nivel intracitoplásmico mientras que sólo el primero se expresaba también en la superficie de membrana (Figura 37-i). Dado que el co-cultivo con estroma modulaba la expresión de ephrinB2 en las células LLC, nos preguntamos si esta molécula también pudiese modificar el fenotipo de las líneas de estroma. En la Figura 37-ii se muestra como tras 3 días de cultivo en presencia de ephrinB2-Fc añadida de forma soluble, la expresión de ambos ligandos se incrementaba en las células Hs27, y más aún si eran co-cultivadas con células LLC. De forma interesante, no encontramos variaciones en la expresión de EphB4 ni al añadir su ligando de forma recombinante ni tras el co-cultivo.

Por otro lado, recuperamos las células LLC tras estos co-cultivos y analizamos su expresión de los receptores BAFF-R y TACI frente a la expresión de ephrinB2. Como se muestra en la Figura 37-iii, encontramos que, en las células LLC co-cultivadas la sub-población ephrinB2^{high} mostraba una expresión elevada de TACI y disminuida de BAFF-R respecto a la población ephrinB2^{int}, mientras que en los cultivos de células LLC solas, establecidos como control, no había diferencias en la expresión de los receptores en relación con la expresión de ephrinB2. Esto apoyaba el posible papel de TACI en la ruta de supervivencia desencadenada por la señalización reverse a través de ephrinB2, también en la comunicación intercelular con el estroma.

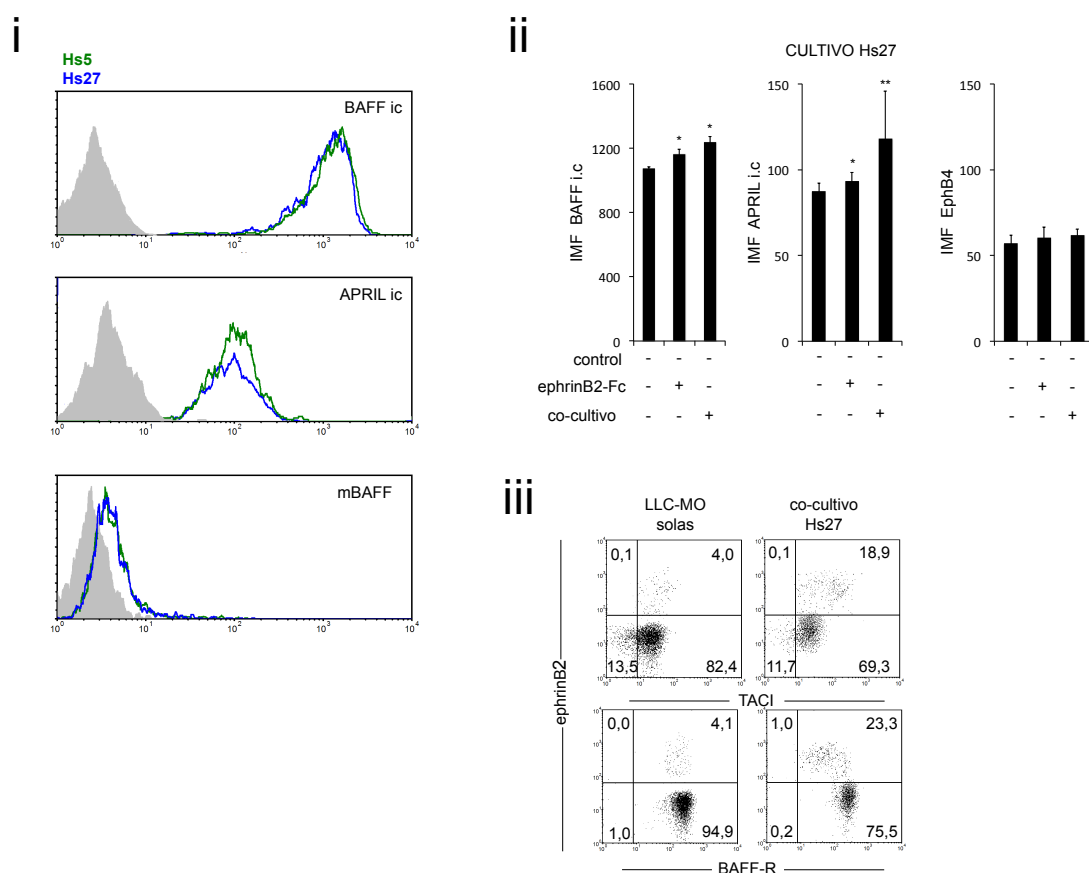


Figura 37. La inducción de la señal *forward* en las células Hs27 incrementa la producción de BAFF y APRIL. (i) Histogramas representativos del análisis de la expresión de BAFF y APRIL por citometría de flujo en las líneas de estroma marcadas con anticuerpos conjugados directamente a fluorocromos. Para las tinciones intracelulares, las células se fijaron previamente en una solución conteniendo paraformaldehído. (ii) Las células Hs27 se estimularon con ephrinB2-Fc (1µg/mL) o se co-cultivaron con células LLC-MO durante 72h antes del análisis de la expresión de los ligandos BAFF y APRIL a nivel intracitoplásmico y EphB4 en la superficie celular en el citómetro de flujo. La significancia estadística de la diferencia entre las medias se valoró mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05; **p<0,001. (iii) Las células LLC-MO se recuperaron de los co-cultivos para el análisis de la expresión de ephrinB2 enfrentada a la de los receptores TACI y BAFF-R. Mostramos dot-plots representativos de los resultados.

A continuación, especulamos con la posibilidad de que la interacción entre ephrinB2, presente en la membrana de las LLC, y EphB4, expresada por las células del estroma, pudiese generar una señal *forward* en éstas que diese lugar a un incremento en la liberación de BAFF y/o APRIL. Añadimos los

Resultados

receptores recombinantes rhBAFF-R y rhTACI a los co-cultivos sembrados 48h antes, para impedir la unión de los posibles ligandos presentes en el medio de cultivo con sus receptores correspondientes y analizamos su efecto sobre la viabilidad de los linfocitos LLC (Figura 38). Como ya habíamos observado, ninguno de los receptores recombinantes inducían cambios significativos en la viabilidad de las células solas, en ausencia de BMSC y sin añadir ningún estímulo. De manera interesante, solo la adición de rhTACI disminuía significativamente la viabilidad de las células LLC respecto al co-cultivo control en ausencia del tratamiento de bloqueo, sugiriendo un papel relevante de BAFF y APRIL al interaccionar con este receptor.

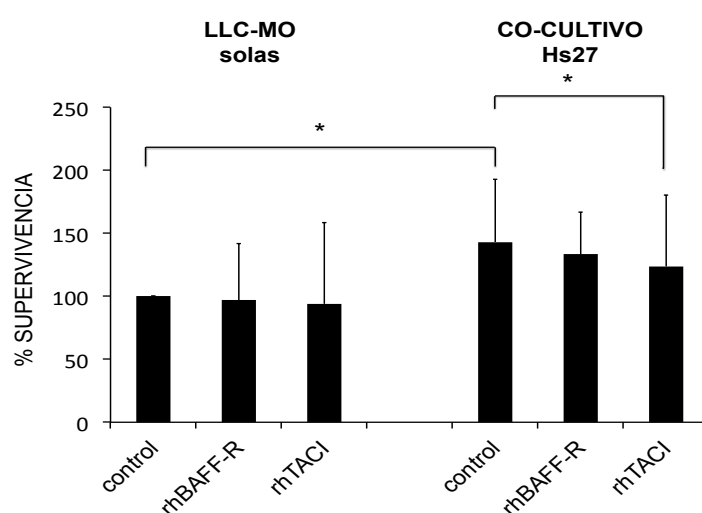


Figura 38. El efecto pro-supervivencia de las Hs27 sobre las células LLC se contrarresta mediante la adición de rhTACI. Co-cultivos de células LLC-MO y Hs27 así como cultivos de células LLC-MO solas, se sembraron durante 48h antes de la adición de las formas recombinantes de BAFF-R y TACI (0,2µg/mL) al medio de cultivo. La supervivencia de las LLC-MO se analizó 24h después de añadir los receptores en el citómetro de flujo. La figura muestra el promedio y desviación estándar de los experimentos con 3 muestras LLC, el porcentaje de supervivencia se relativizó a la condición control de células LLC solas, sin tratar, considerada como el 100%. La significancia estadística de las diferencias se determinó mediante la prueba T-student para muestras pareadas * $p < 0,05$.

Previamente habíamos mostrado como los medios condicionados obtenidos tras el cultivo de BMMSC estimuladas con ephrinB2-Fc o co-cultivadas con linfocitos LLC, rescataban la viabilidad de estos últimos. Los resultados anteriores sugerían que BAFF y/o APRIL eran unos de los factores fundamentales presentes en dichos medios. Realizamos un nuevo ensayo en el que recuperamos los medios condicionados por cultivos de células Hs27 solas, estimuladas con ephrinB2-Fc o bien co-cultivadas con células LLC, y los añadimos a nuevos cultivos de células LLC juntos con distintos tratamientos de bloqueo para los ligandos. En este caso, además de los receptores recombinantes, empleamos anticuerpos contra BAFF y APRIL que no empleamos en los experimentos de co-cultivo porque pudiesen unir los ligandos expresados en su forma de membrana tanto por las Hs27 como por los linfocitos. Medios de cultivo sin tratamiento, con ephrinB2-Fc o recuperado de cultivos de células LLC solas, se recuperaron y añadieron a los nuevos cultivos como control.

Como puede verse en la Figura 39, todos los tratamientos de bloqueo disminuían la viabilidad de las células LLC-MO cultivadas con medio condicionado por el cultivo de las Hs27 y más aún si éstas habían sido estimuladas con ephrinB2-Fc o con células LLC. Por el contrario, ni los receptores recombinantes ni los anticuerpos para secuestrar los ligandos, disminuían significativamente la viabilidad de las células LLC cultivadas con los medios control, que no contenían factores secretados por BMMSC.

En definitiva, nuestros resultados apoyaban la existencia de un mecanismo en el microambiente de médula ósea, mediante el cual las células LLC-MO inducen la activación de la señalización forward a través de EphB4 en las BMMSC. Esta señalización desencadena una mayor producción y liberación al medio de BAFF y APRIL que incrementan la supervivencia de las células LLC-MO principalmente a través de la unión TACI.

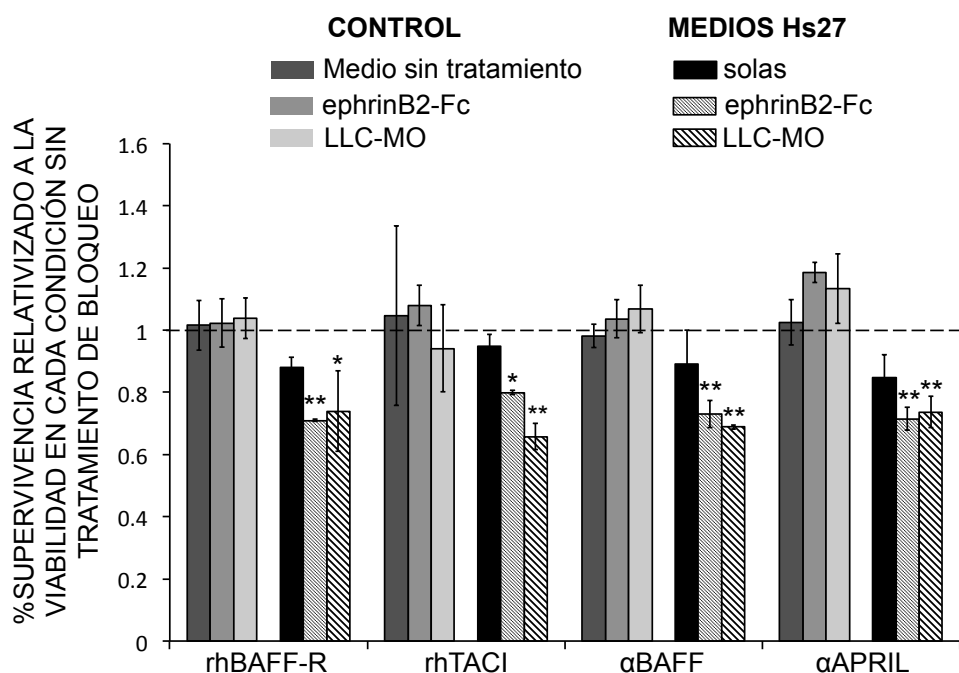


Figura 39. La presencia de distintos tratamientos de bloqueo de la unión de los ligandos BAFF y APRIL inhibe el efecto pro-supervivencia de los medios condicionados de los co-cultivos con células HS27. Medios condicionados por el cultivo de células Hs27 solas, estimuladas con ephrinB2-Fc (0,2µg/mL) o co-cultivadas con LLC-MO durante 72h, se añadieron a nuevos cultivos de células LLC en presencia o ausencia de rhBAFF-R, rhTACI (0,2µg/mL) , αBAFF o αAPRIL (0,1µg/mL). La viabilidad se analizó a las 72h en el citómetro de flujo. La figura muestra el promedio y desviación estándar de los experimentos con 3 muestras LLC. El porcentaje de supervivencia se relativizó para cada condición a su correspondiente control sin tratamiento de bloqueo. La significancia estadística de las diferencias se valoró mediante la prueba T-student para muestras pareadas *p<0,05 **p<0,01.

DISCUSIÓN

La presente Tesis doctoral profundiza en la caracterización de la familia de tirosin-quinasas Eph/ephrin en el contexto del microambiente de médula ósea de la leucemia linfocítica crónica. Describimos por primera vez la sobreexpresión de ephrinB2 en las células LLC obtenidas de médula ósea en comparación con las extraídas de la sangre periférica de los pacientes. Más aún, encontramos que ephrinB2 presentaba un perfil de expresión bimodal en las LLC-MO, existiendo una población con expresión elevada (ephrinB2^{high}) altamente dependiente de las señales proporcionadas por las células del estroma de médula ósea.

De forma relevante, encontramos que la expresión de ciertos ligandos y receptores dentro de la sub-familia Eph/ephrin-B, correlacionaba con distintos parámetros clínicos de la LLC indicativos de peor pronóstico o progresión de la misma. En especial, la asociación entre el patrón de infiltración medular y la expresión de ephrinB2 en las células LLC y EphB4 en las BMMSC, apuntaba a un significado funcional de esta pareja de moléculas en el establecimiento de un nicho hematopoyético favorable para el posterior desarrollo de la enfermedad.

Analizamos los mecanismos de señalización desencadenados por la interacción entre ephrinB2 y EphB4 expresadas por los linfocitos LLC y las BMMSC respectivamente, así como entre las mismas células LLC (interacciones homotípicas). Determinamos la importancia tanto de la señal *forward* como de la señal *reverse*, siendo responsables de la secreción los factores solubles pro-supervivencia BAFF y APRIL por parte de ambos tipos celulares que sostendrían la viabilidad de las células LLC residentes en médula ósea en distintos momentos del desarrollo de la enfermedad, protegiéndolas tanto de la apoptosis espontánea como de la inducida por los tratamientos farmacológicos.

1.- EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE Eph/ephrin DIFIERE ENTRE LOS COMPARTIMENTOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA.

Los resultados previos de nuestro grupo habían mostrado la expresión heterogénea de la familia Eph/ephrin en pacientes LLC en comparación con la encontrada en sujetos sanos destacando la elevada expresión de ephrinA4 y su relación con mecanismos de migración transendotelial. A pesar de su creciente interés, el papel de Eph/ephrin en el sistema inmune sigue estando poco explorado y en particular la expresión y función de estas moléculas en los linfocitos B (Aasheim y cols., 2000, Zamora y cols., 2006, Nakanishi y cols., 2007). En vista del creciente número de trabajos que relacionan esta familia de moléculas con los mecanismos de hematopoyesis (Zhao y cols., 2006, Ting y cols., 2010, Nguyen y cols., 2015) parecía necesario realizar un estudio de la expresión y función de estas moléculas en el contexto del microambiente de médula ósea de la leucemia linfocítica crónica.

Nuestro análisis de la expresión de la familia Eph/ephrin por qPCR en muestras LLC de sangre periférica y médula ósea relativizada a la de linfocitos B aislados de donantes sanos, mostró la ausencia de expresión en prácticamente todos los pacientes analizados, de ephrinB3 y de los receptores Eph A3, A5, A7 y A8 en ambos compartimentos celulares. Mientras que, en concordancia con los perfiles de expresión descritos previamente a partir del análisis por qPCR convencional (Alonso-Colmenar y cols., 2009), ephrinA4, EphA4 y EphB6 eran expresadas por todas las muestras y sus niveles de expresión los más elevados de toda la familia de moléculas en sangre periférica.

De manera interesante, detectamos por primera vez la expresión significativa de los ligandos ephrinB1 y ephrinB2 en LLC así como del receptor EphB4. Al realizar un análisis comparativo de la expresión de Eph/ephrin entre ambos compartimentos celulares, los resultados mostraron que ephrinB2 se encontraba significativamente sobre-expresada en las células LLC-MO. La expresión de este ligando se identificó por primera vez en el desarrollo del sistema nervioso (Lu y cols., 2001) y posteriormente se demostró su

implicación en procesos de vasculogénesis y angiogénesis (Yuan y cols., 2004, Poitz y cols., 2015). Sin embargo, los trabajos sobre su función en el sistema inmune y en particular en la biología de los linfocitos B siguen siendo escasos. Ivanova y cols., identificaron por primera vez su expresión a nivel génico en células madre hematopoyéticas (HSC) de origen murino y humano (Ivanova y cols., 2002). Posteriormente otros trabajos mostraron la implicación de la señalización mediada por ephrinB2 en los mecanismos de migración de los linfocitos T de ratón en respuesta a quimioquinas aunque la expresión detectada en los linfocitos B era insignificante (Yu y cols., 2003). Así mismo, Zamora y cols., determinaron la expresión de ephrinB2 a nivel del mensajero y de proteína en PBLs humanos estimulados con TNF- α y SDF1 α , pero no en condiciones basales. Más aún, encontraron la expresión de esta molécula en las células B aisladas sin estimular (Zamora y cols., 2006). El análisis mediante citometría de flujo de la presencia de ephrinB2 en las células LLC confirmó la sobre-expresión en MO frente a SP pero además mostró la existencia de un perfil bimodal en las LLC-MO de manera que se observaba una sub-población con expresión muy elevada de esta molécula, ausente en las LLC-SP.

La significancia de la familia Eph/ephrin en cáncer es compleja. Tanto receptores como ligandos pueden tanto promover como inhibir la proliferación de distintos tumores. Por lo que no solo un incremento en la expresión de estas moléculas, sino también su disminución, se ha relacionado con la progresión de la enfermedad. Nuestros resultados mostraron el incremento en la expresión de ephrinB1 y ephrinB2 en las LLC-MO de pacientes que se encontraban en estadios avanzado de la enfermedad según el criterio de Rai. Como ya había sido descrito, la elevada expresión de ephrinA4 se asociaba con estadios más tempranos mientras que muestras con peor pronóstico mostraban un incremento en la expresión de EphB6 (Alonso-Colmenar y cols., 2009). De manera interesante, la expresión de EphB4 era significativamente más elevada en pacientes en estadios 3-4 de Rai, al contrario que en otros cánceres en los que la expresión de este receptor se encuentra incrementada en el origen de la patología mientras que disminuye durante la progresión de la enfermedad de

manera que disminuye su actividad supresora del tumor (Batlle y cols., 2005, Davalos y cols., 2006).

Así mismo, la expresión de ephrinB1, ephrinB2 y EphB4, se encontraba incrementada en pacientes que presentaban factores con peor pronóstico como positividad para ZAP70 o ausencia de mutaciones en las cadenas IGVH, en el caso de los ligandos. El hecho de que tanto EphB4 como su único ligando, ephrinB2 tuviesen una expresión destacada en ciertos pacientes con características concretas, sugería que su interacción podría ser relevante en el desarrollo de la patología.

2.- EL PAPEL DE ephrinB2 EN EL NICHOS TUMORAL DE MÉDULA ÓSEA EN LA LLC

La expresión diferencial que ephrinB2 mostraba en las células LLC-MO indicaba que podría tener un papel importante dentro del nicho tumoral de médula ósea en esta enfermedad. De forma sorprendente, el cultivo en medio completo de las LLC-MO disminuía la expresión en membrana del ligando en la población mayoritaria con una expresión ephrinB2^{int} y la sub-población ephrinB2^{high} prácticamente desaparecía. De manera similar, Zamora y cols., habían observado la caída en la expresión de ephrinB2 en linfocitos B aislados de sangre periférica, estimulados *in vitro* con α lgM durante 3-6 horas (Zamora y cols., 2006). Aunque este trabajo atribuía la disminución en la expresión al estímulo a través del BCR, no mostraban los efectos del propio cultivo sobre la misma por lo dicha caída en la expresión en membrana podría deberse no a la estimulación sino mas bien a la pérdida de señales al aislar la población de linfocitos B de otros tipos celulares.

De manera interesante, el co-cultivo con BMMSC incrementaba la expresión de ephrinB2^{int} y recuperaba el fenotipo ephrinB2^{high} en las LLC de MO, de acuerdo con el trabajo de Okubo y cols., quienes habían mostrado que la expresión de ephrinB2 en una línea de células madre hematopoyéticas dependientes de estroma y en HSC primarias, era claramente dependiente del contacto con células de estroma con expresión elevada de EphB4 (Okubo y cols., 2006).

La caracterización inmunofenotípica de la sub-población ephrinB2^{high} mostró que presentaba características diferenciales respecto a la población LLC mayoritaria. Entre ellas destacaban el incremento en la expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha L\beta 2$ y de otras moléculas de adhesión como CD44, así como de CD38 y Bcl2. Mientras que observamos menor presencia del receptor CXCR4, características compatibles con un fenotipo de retención en el nicho medular. En concordancia con estos resultados, el cultivo de las células LLC-MO sobre fibronectina o los ligandos de las integrinas VCAM-1 o ICAM-1,

recuperaba los niveles de expresión de ephrinB2 encontrados en las células recién aisladas de médula ósea, pero no de sangre periférica, incrementando a su vez la viabilidad de las primeras. Estos datos sugerían que la señalización a través de ephrinB2 pudiese dar lugar a mecanismos de adhesión mediados por integrinas como ya había sido sugerida por Meyer y cols., al analizar la función de esta molécula en relación con los procesos invasivos de las células malignas de melanoma (Meyer y cols., 2005). Así mismo, se ha descrito la relación entre ephrinB2 y la integrina $\alpha 4\beta 1$ en pacientes de leucemia linfocítica aguda con peor pronóstico (Shalapour y cols., 2011).

La adición al medio de cultivo de las quimioquinas BAFF, APRIL y CXCL12 tuvo el mismo efecto que los ligandos de integrinas sobre la viabilidad de las células LLC y su expresión de ephrinB2. Mientras que, confirmando lo observado por Zamora y cols., aunque α lgM y CD40L sí sostenían parcialmente la viabilidad de las células LLC, no afectaban a la expresión del ligando. Más aún sólo en los cultivos en presencia de VCAM-1, BAFF y APRIL encontrábamos células ephrinB2^{high}, lo que afianzaba la idea de que esta subpoblación era muy dependiente del contacto con otros tipos celulares con elevada expresión de estos ligandos. EphrinB2 podría ser una molécula fundamental en distintos mecanismos de supervivencia o proliferación dependientes de la adhesión e interacción con las BMMSC del nicho tumoral.

El componente proliferativo dentro de la LLC se corresponde a un 1% de la masa tumoral total y se encuentra restringido a una regiones concretas dentro del nicho tumoral denominadas pseudofolículos o centros proliferativos. Estudios previos habían descrito como las células LLC albergadas en estas estructuras e identificadas mediante el marcador de proliferación Ki67, poseían distintas características immuno-fenotípicas respecto a las células circulantes en sangre periférica como elevada expresión de CD23 y CD38 (Schmid y cols., 1994) (Granziero y cols., 2001, Soma y cols., 2006) y disminución del receptor de CXCL12, CXCR4 (Bennett y cols., 2007). Dado que en las células ephrinB2^{high} habíamos encontrado la sobreexpresión de CD38 y una menor presencia de CXCR4 en su membrana, nos planteamos que pudiesen

corresponder a una sub-población residente en médula ósea con alta capacidad de autorrenovación responsable del inicio de la patogenia y del mantenimiento de la enfermedad. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que las células Ki67⁺ encontrado en nuestras muestras se encontraba dentro de las células ephrinB2^{int}. Sin embargo, Bennett y cols., también mostraron que no existe una relación directa entre la expresión de CD38 y la de Ki67 y más aún el marcador de proliferación estaba ausente en las células con una expresión mas elevada de CD38. Así mismo, estos autores defienden que las células en reposo expresan altos niveles de CXCR4, lo que les permite migrar hacia los pseudofolículos en respuesta a la expresión de CXCL12 por parte de las células del estroma. Sin embargo, una vez que las células LLC contactan con las BMMSC, la expresión del receptor disminuiría previamente a la re-entrada de las células en el ciclo celular. La inhibición de la unión con CXCL12 mediante el uso de péptidos específicos contra CXCR4 bloquea los efectos migratorios y anti-apoptóticos apoyando la importancia de esta interacción (Burger y cols., 2005). Nuestras observaciones de secciones de médula ósea de pacientes mostraron que las células con elevada presencia de ephrinB2 en membrana en contacto con BMMSC EphB4⁺, no expresaban Ki67. Por ello, se trata de una población quiescente en la que otros estímulos, sin concretar aún, independientes del contacto con BMMSC, podrían inducir la proliferación acompañada de una caída en la expresión de ephrinB2. De acuerdo con los trabajos de Purroy y cols., observamos que la estimulación conjunta a través del BCR y CD40L potenciaba la división de células LLC-MO en co-cultivo con BMMSC (Purroy y cols., 2015), encontrando que las células en división presentaban una expresión intermedia de ephrinB2.

Todas estas evidencias apoyan la idea de que, también en la LLC, la población en la que tiene lugar el primer evento oncogénico podría corresponderse con HSC CD34⁺ CD38⁻ que no expresan CD19 ni CD5, (Kikushige y cols., 2015) al contrario que las LLC-MO ephrinB2^{high}. Estas células poseerían anomalías intrínsecas que las predispondrían a la generación de múltiples clones LLC. Posteriormente, uno o unos pocos de estos clones serán seleccionados en un proceso en el que es fundamental la

interacción antigénica con el BCR. De esta manera, se sostiene la importancia en el desarrollo de la patogenia de la LLC, del reconocimiento de las LLC, de determinados antígenos y auto-antígenos, que conduciría a la existencia de un repertorio restringido del BCR, característico de las células LLC en un proceso en el que tendrían un papel relevante células del estroma (Murray y cols., 2008, Zenz y cols., 2010). Así mismo, esta población de HSC cancerígenas podrían presentar una mayor resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos frecuentes enfocados contra células B de estadios avanzados de maduración (rituximab, fludarabina, bendamustina, ciclofosfamida). De manera interesante, se ha descrito recientemente la elevada expresión de ephrinB2 en HSC murinas CD34⁺ CD38⁻ (Nguyen y cols., 2015) lo que contribuye a no descartar un posible papel de esta molécula en el inicio de la patogenia en la LLC a partir de esta población celular.

En definitiva, nuestros resultados nos permitían descartar que la sub-población ephrinB2^{high}, tuviese una mayor capacidad proliferativa que permitiese la regeneración de la masa tumoral a partir de la misma. Sin embargo, al analizar la capacidad de adhesión de las LLC-MO a las BMMSC *in vitro* observamos que sólo las ephrinB2^{high} interaccionaban de forma estable con el estroma. Estos datos afianzaban la idea de que estuviésemos ante una sub-población residente en médula ósea con una capacidad diferencial de resistencia a los fenómenos de apoptosis mediados por adhesión.

3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES Y DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS MISMOS QUE CONFORMAN EL MICROAMBIENTE DE MÉDULA ÓSEA EN LA LLC. PAPEL DE EphB4.

La importancia de las interacciones entre las células LLC y otros tipos celulares de su entorno, se ha incrementado sensiblemente en los últimos años ganando relevancia la idea de que ciertas células en concreto son responsables de la regulación de la supervivencia, proliferación y homeostasis de las células tumorales. De forma significativa, estas relaciones podrían desencadenar tanto el inicio de la enfermedad como mecanismos que proporcionasen resistencia frente a la apoptosis inducida por fármacos. Más allá, otro de los interrogantes más importantes que se han abierto en relación al nicho medular en esta enfermedad es la posibilidad de que las propias células LLC puedan modificar el microambiente a su favor (Burger, 2011).

Dado que ephrinB2 era la molécula predominantemente expresada por las células LLC-MO era lógico pensar que sus receptores también se encontrarían en el nicho medular. A pesar de la conocida promiscuidad de esta familia de moléculas, ephrinB2 interacciona preferentemente con EphB4 (Pasquale, 1997). En BMMSC el papel de EphB4 ha sido descrito principalmente en fenómenos relacionados con la osteogénesis (Zhao y cols., 2006, Arthur y cols., 2011, Matsuo y cols., 2012). Sin embargo, en los últimos años ha crecido el número de trabajos que otorgan a EphB4, expresada por las BMMSC, la capacidad de sostener la población de HSC, en parte modulando la expresión de ephrinB2 en las mismas, así como de regenerar un nicho hematopoyético funcional (Okubo y cols., 2006, Nguyen y cols., 2015). Así mismo, *Anam and Davis* se propusieron analizar en profundidad qué rutas de señalización podían desencadenarse por la interacción entre HSC y BMMSC (Anam y cols., 2013). Su análisis mediante RT-qPCR de la expresión diferencial entre ambos tipos celulares de receptores tirosin-quinasa, receptores anclados a proteína-G y receptores de citoquinas, mostró la sobreexpresión de EphB4, y A1,A2, A4 y A7 aunque en una magnitud muy inferior, en BMMSC respecto a los niveles de ARNm encontrados en HSC. Nuestros

resultados mostraron la expresión de EphB4 en las células mesenquimales de la LLC tanto *in vivo* como *in vitro*.

El estroma de médula ósea de la condición sana está compuesto por distintas poblaciones celulares. La ocurrencia de un síndrome linfoproliferativo puede alterar la estructura del nicho de médula ósea de distintas formas dependiendo del tipo de linfoma. En el caso de la LLC, el estroma original es mayoritariamente reemplazado al producirse la expansión clonal del tumor. Al contrario que en otras patologías, como el linfoma folicular, en el que los agregados linfoides se desarrollan, al menos al inicio de la infiltración, en contacto estrecho con las células reticulares del estroma pre-existente (Vega y cols., 2002). La población estromal mayoritaria extraída de pacientes de LLC se corresponde con células mesenquimales CD45⁻, STRO-1⁺, CD90⁺, CD73⁺ fundamentalmente (Kurtova y cols., 2009), al contrario que en otros casos como el linfoma de células grandes en los que predominan células NLCs CD68⁺ (Ruan y cols., 2006). Nuestros análisis corroboraron este fenotipo tanto en BMMSC obtenidas de muestras de pacientes LLC como de donantes sanos. Existe cierta controversia respecto a las diferencias fenotípicas y a la capacidad protectora entre BMMSC sanas y las extraídas de diferentes patologías hematológicas. Aunque se ha descartado que las BMMSC tengan su origen en el mismo clon malignizado que las células LLC así como que posean anomalías citogenéticas propias de ciertas patologías hematológicas (Campioni y cols., 2012), otros trabajos atribuyen al estroma LLC características intrínsecas, como una capacidad alterada en la secreción de citoquinas, que permiten que sostengan preferentemente la viabilidad de las células LLC en el nicho de médula ósea (Pontikoglou y cols., 2013). Así mismo, los ensayos funcionales *in vitro* con BMMSC de ambas procedencias, también muestran resultados contradictorios en distintos trabajos respecto a la capacidad protectora de estas células sobre linfocitos LLC o sanos (Trimarco y cols., 2015). Posiblemente, estas discrepancias puedan deberse a la ausencia de un criterio establecido para el aislamiento de la población mesenquimal y seguidamente del sistema de co-cultivo. Por lo que cada trabajo presenta diferencias en relación al grado de confluencia de las BMMSC y al tiempo de

co-cultivo hasta el análisis de la supervivencia. De forma relevante, nuestros resultados destacan la importancia de la presencia de las LLC en el co-cultivo con BMMSC. Para la expansión de las BMMSC-LLC, los linfocitos LLC se mantuvieron en el cultivo durante 2-3 semanas, mientras que, por el contrario, el establecimiento de los cultivos de BMMSC de donantes sanos se realizó en ausencia de células LLC. En estas condiciones, la capacidad protectora de las BMMSC-LLC era mucho mayor que las de las BMMSC-sanas, sin embargo, si éstas se pre-cultivaban con células LLC con elevada expresión de ephrinB2 su capacidad de sostener la supervivencia aumentaba significativamente. Estos resultados evidencian la capacidad de las LLC para modificar otros componentes del microambiente en su favor. Cada vez hay más trabajos que tratan de esclarecer los mecanismos por los que las células tumorales son capaces de modular las propiedades del nicho. Nuestros resultados resaltan el papel de la interacción a través de ephrinB2, expresada por las LLC-MO, y EphB4 presente en la membrana de las BMMSC. El contacto entre ambos tipos celulares incrementaba la producción de citoquinas como BAFF y sobre todo APRIL, así como del ligando de VLA-4, VCAM-1, de forma similar a lo descrito por Lwin y cols., generándose un microambiente dentro del nicho tumoral que alberga una población de células LLC con mayor resistencia a la apoptosis (Lwin y cols., 2009). Queda evidenciada la importancia en este proceso de los contactos intercelulares pero también de los factores solubles secretados como consecuencia de los mismos. Recientemente, Paggetti y cols., han descrito un mecanismo mediante el cual las células LLC liberan exosomas que interaccionan con BMMSC a través de proteoglicanos y moléculas específicas de la superficie de membrana como ICAM-1 (Paggetti y cols., 2015). Al ser incorporados, liberan su contenido compuesto de proteínas, RNAs y miRNAs específicos, induciendo en ellas cambios fenotípicos que activan rutas que tienen como consecuencia la liberación de citoquinas pro-inflamatorias.

EphB4 se encuentra sobre-expresada en las células del estroma de pacientes LLC frente al de individuos sano. Sin embargo, su expresión no se ve alterada ni por el co-cultivo con linfocitos LLC ni por estímulos inflamatorios como ya había sido descrito por otros autores (Zamora y cols., 2006). Por

tanto, no podemos decir que su sobre-expresión es consecuencia de la expansión del clon LLC, aunque estas evidencias sí permiten otorgar a EphB4 un papel constante dentro del nicho tumoral LLC permitiendo que este receptor interaccione con las células LLC con expresión destacada de ephrinB2.

Durante años se han hecho múltiples esfuerzos para tratar de asociar la población mesenquimal de médula ósea con alta plasticidad y potencial de diferenciación, con un conjunto de marcadores fenotípicos concretos. A pesar de haberse acordado qué moléculas debían ser o no ser expresadas por estas MSC (Dominici y cols., 2006), se plantea el problema de que moléculas como CD73, CD90 y CD105 son expresadas por múltiples tipos celulares. De forma añadida, distintos autores resaltan la heterogeneidad dentro de las BMMSC, entre distintos donantes e incluso dentro del mismo individuo. Ciertas variaciones podrían evitarse estableciendo criterios a la hora de la toma de la muestra, el origen de la misma o el sistema de cultivo. Sin embargo, cada vez más autores defienden que existe una heterogeneidad intrínseca a cada muestra que permite la existencia de distintas sub-poblaciones que a su vez son claves en los beneficios que estas células proporcionan en su microambiente (Phinney y cols., 2013). Tratar de definir combinaciones de marcadores que permitan identificar sub-poblaciones de BMMSC con distinta capacidad funcional es uno de los grandes retos abiertos en este campo. En relación con esto, nuestros resultados mostraron la importancia de aquellas BMMSC con las que contacta selectivamente la población LLC-MO ephrinB2^{high}.

En vista del papel preferente que tanto EphB4 como ephrinB2 parecían tener un papel en el establecimiento del nicho de médula ósea quisimos analizar la expresión de ambas moléculas en función del patrón de infiltración medular, uno de los factores pronóstico que se describieron primeramente en la LLC (Pangalis y cols., 1984, Rozman y cols., 1984). De forma relevante, la proporción de BMMSC EphB4⁺ disminuía significativamente en las biopsias de pacientes con un patrón de infiltración difuso. En el caso de la expresión de ephrinB2 en las células LLC, no sólo encontramos que la expresión se

incrementaba en los casos de infiltración nodular o intersticial sino que el porcentaje de la sub-población ephrinB2^{high} también era mayor en estas condiciones y en concordancia, el porcentaje de células ephrinB2^{high} correlacionaba de forma inversa con el grado de infiltración (%LLC). Más aún, al igual que el tipo de infiltración, junto con otros parámetros, se ha considerado tradicionalmente para determinar una posible necesidad de tratamiento por evolución de la enfermedad, nuestros resultados mostraron que esta sub-población también estaba incrementada en aquellos pacientes que necesitaban tratamiento tras la muestra. Por tanto, el porcentaje de ephrinB2 podría ser considerado en un futuro de aplicación en la clínica como marcador pronóstico asociado al patrón de infiltración. De forma interesante, las células ephrinB2^{high} también se veían enriquecidas respecto a la masa tumoral total en los pacientes después de recibir tratamiento. Por lo que esta sub-población podría tener un significado funcional dentro del microambiente, siendo fundamental en el establecimiento del nicho tumoral al inicio de la enfermedad y responsable de la regeneración de ésta tras los tratamientos.

4.- PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN EphB4-ephrinB2 EN EL NICHOTUMORAL DE LA LLC

La familia de tirosin-quinazas Eph/ephrin desempeña su función a través de interacciones célula-célula que generan mecanismos de adhesión-repulsión que a su vez regulan la migración de las células y la organización espacial de distintos tipos celulares en los tejidos (Pasquale, 2005)(Pasquale, Nat Rev Mol Cell Biol 2005). Una vez identificados en el microambiente de médula ósea, el tándem EphB4-ephrinB2 eran unas candidatas perfectas para formar parte de los mecanismos que regulan la interacción de las células LLC dentro del nicho tumoral.

La interacción entre Eph-ephrin da lugar a una señalización bidireccional, de forma que puede desencadenarse una señal *forward* hacia el interior de la células que porta el receptor, y una señal *reverse* en la célula que expresa el ligando en su membrana (Pasquale, 2008) con distintos efectos en función del tipo y contexto celular. Se ha descrito que la interacción entre receptor y ligando puede dar lugar a repulsión celular, de manera que o bien ciertos mecanismos de endocitosis promueven la internalización de ambos, o bien por procesamiento proteolítico se eliminan los dominios extracelulares de las proteínas implicadas. Sin embargo, en algunos contextos celulares los complejos Eph-ephrin son muy estables y generan una prolongada señal bidireccional que promueve la adhesión. A pesar de que en el caso de la interacción entre EphB4 y ephrinB2, distintos trabajos muestran su implicación en fenómenos de repulsión celular regulando el desarrollo de los circuitos neuronales o la vasculogénesis (Lu y cols., 2001, Fuller y cols., 2003) nuestros resultados indican el papel fundamental de este tándem en la adhesión de las células LLC a componentes del estroma en el contexto de médula ósea de la LLC.

Los ensayos de las células LLC-MO en cultivo con proteínas recombinantes Eph/ephrin, mostraron que EphB4-Fc inmovilizada sobre la superficie de cultivo, y ephrinB2-Fc en menor medida, incrementaban

significativamente la viabilidad de las células. Sin embargo, la adición de ambas proteínas recombinantes de forma soluble a los cultivos disminuía la supervivencia. Así mismo, el co-cultivo con BMMSC con expresión de EphB4 incrementaba la viabilidad in vitro de las LLC. Al pre-incubar las células LLC con EphB4-Fc, antes de añadirlas sobre el cultivo de BMMSC, no observábamos los efectos pro-supervivencia de éstas. Sin embargo, el tratamiento previo de las células de estroma con ephrinB2-Fc incrementaba su capacidad protectora así como la adhesión entre ambos tipos celulares. Este resultado evidenciaba que los tratamientos con las proteínas recombinantes bloqueaban la interacción intercelular pero no podíamos descartar que ejerciesen una señalización sobre la célula estimulada. En concreto, mostraba el papel de la inducción de la señal *forward* en el estroma como un nuevo mecanismo para sostener la supervivencia de las LLC.

De forma relevante, el silenciamiento de la expresión de ephrinB2 en las células LLC-MO mediante siRNA disminuía significativamente la viabilidad del cultivo en ausencia de estímulos exógenos y también de aquellas co-cultivadas con BMMSC. Del mismo modo, al silenciar la expresión de EphB4 en las líneas de estroma, perdían su capacidad de sostener la supervivencia de las células LLC. Por tanto, confirmábamos los resultados de los tratamientos de bloqueo con las proteínas recombinantes y la hipótesis de que la señalización *reverse* a través de ephrinB2 en las células LLC-MO tiene un papel relevante en su supervivencia.

La señalización *forward* activada por la unión de ephrin al receptor correspondiente, fue considerada durante mucho tiempo como un mecanismo de supresión tumoral, debido a la baja actividad de los receptores Eph con elevada expresión en numerosas líneas tumorales (Noren y cols., 2006, Pasquale, 2008, Kumar y cols., 2009). De forma añadida, la inducción de la señalización *forward* mediante estimulación con proteínas de fusión correspondientes a los ligandos ephrin inhibía la proliferación, supervivencia y migración de diversas células cancerígenas, además de frenar el crecimiento tumoral en modelos de ratón (Noren y cols., 2007). Más aún, se ha

demostrado que una forma dominante negativa del receptor EphB4, es capaz de promover la proliferación en un modelo de cáncer colorrectal (Doposo y cols., 2009). Sin embargo, las células tumorales pueden emplear distintos mecanismos para minimizar los efectos de regulación negativa sobre proliferación y supervivencia de la señal *forward*, y hasta en ciertos contextos celulares, los receptores Eph activados por sus ligandos pueden perder la capacidad supresora y adquirir habilidades oncogénicas (Yang y cols 2006). De acuerdo con nuestros resultados, el silenciamiento de la expresión de EphA2 y EphB4 mediante siRNA tiene como consecuencia la represión de la actividad tumoral *in vitro* e *in vivo* (Kumar y cols., 2009). Así mismo, otros autores han mostrado como la estrategia de impedir la interacción EphB4-ephrinB2, mediante fragmentos del dominio extracelular de EphB4 capaces de bloquear ambas señales, inhibe el crecimiento tumoral, al menos en parte disminuyendo la angiogénesis (Martiny-Baron y cols., 2004, Kertesz y cols., 2006).

Nuestras aproximaciones experimentales se han centrado en determinar la importancia de las interacciones en *trans* entre ephrinB2 y EphB4. Sin embargo, no permiten descartar interacciones en *cis* entre receptores y ligandos expresados en la membrana de una misma célula. Este tipo de interacciones han sido descritas en distintas familias de receptores en el sistema nervioso y en el sistema inmune, como mecanismos que atenúan los efectos de las interacciones en *trans*, pero siguen estando poco estudiados (Nitschke, 2009, Ware y cols., 2011, Yaron y cols., 2012). A pesar de la importancia de la familia Eph/ephrin en cáncer, este tipo de interacciones prácticamente no han sido estudiadas en este contexto. De manera interesante, Falivelli y cols., encontraron que la co-expresión de ephrinB2 en líneas tumorales de mama y pulmón inhibía la unión de la proteína recombinante ephrinB2 a la superficie de estas células, así como la fosforilación del receptor EphB4 inducida por ephrinB2-Fc (Falivelli y cols., 2013). Más aún, la interacción en *cis* de ephrinB2 con EphA3 también inhibía la activación de este, a pesar de que su interacción en *trans* no es posible. Por tanto, es posible que en algunos casos en los que el ligando no puede interaccionar con un receptor concreto a través de su dominio de unión a

ephrin, sí sea capaz de regular su actividad mediante asociaciones en *cis* con otro dominio proteico. Estas consideraciones deben tenerse en cuenta en futuras interpretaciones de la señalización derivada de la interacción entre Eph y ephrin en un contexto tumoral.

Como hemos mostrado previamente, nuestros resultados indicaban un papel preferente de la sub-población ephrinB2^{high} en el contacto con las células del estroma de médula ósea EphB4 positivas. Sin embargo, debido al bajo porcentaje de estas células y a su alta dependencia de señales extrínsecas, resultaba difícil atribuirle la capacidad de sostener la viabilidad del grueso de la población LLC. Más aún, la mayoría de las células tumorales se encuentran circulantes en sangre periférica y de forma añadida, el análisis histológico de la acumulación de células LLC en órganos linfoides secundarios muestra que, a pesar de la ocurrencia de otros tipos celulares como células T o componentes del estroma, los linfocitos LLC interactúan preferentemente entre ellos. Parece lógico pensar que debe existir algún mecanismo independiente del contacto con BMMSC que permita la expansión del tumor.

Dado que tanto ephrinB2 como EphB4 eran expresadas por las LLC-MO, planteamos la hipótesis de que las interacciones homotípicas entre ellas mismas a través de estas moléculas pudiesen sostener la supervivencia de la masa tumoral.

A pesar del gran número de trabajos que se han centrado en investigar las posibles interacciones de las LLC con otros tipos celulares, el análisis de las interacciones homotípicas ha recibido poca atención. Sin embargo, ya Pettit y cols., mostraron la implicación tanto de factores solubles, sin especificar, como de los contactos célula-célula aunque no fueran estables a lo largo del tiempo de cultivo, en la supervivencia de las LLC en cultivos con alta densidad celular (Pettitt y cols., 2001). Más recientemente, otros autores han incidido sobre la importancia de las interacciones homotípicas con un papel diferencial frente a las interacciones con otros componentes del microambiente (Hutchinson y cols., 2014). En este trabajo, los autores describen cambios morfológicos en

las células LLC en cultivo, mostrando el reordenamiento de los filamentos de actina dando lugar a extensas prolongaciones, frente al aspecto de estas células en sangre periférica con una morfología globular y pequeñas vellosidades en la superficie. Estos cambios se diferenciaban de aquellos observados en la interacción de las células LLC con otros tipos celulares como linfocitos T o NLCs (Schrottner y cols., 2009) o inducidos por la presencia de quimioquinas como CXCL12 en los que las células adquirirían una forma más elongada. Así mismo, muestran la formación de agregados compuestos únicamente de células LLC que se encontraban en equilibrio dinámico en el cultivo, puesto que las células interaccionaban entre sí de forma frecuente pero transitoria, movimientos que se han descrito en procesos del desarrollo normal de linfocitos B (Carrasco, 2010). De forma interesante, la morfología de las LLC en secciones de ganglios linfoides o médula ósea se asemejaba mucho más a la encontrada en los cultivos. De acuerdo con estos resultados, nosotros observamos la formación de pequeños agregados en los cultivos de células LLC-MO, pero no en los de LLC-SP, en los que encontramos acumulación de ephrinB2 en los sitios de contacto.

Hutchinson y cols., muestran la elevada expresión de la quinasa ABL1 en las células LLC y su implicación en estos fenómenos mediante la interacción con F-actina. La inhibición de su actividad mediante imatinib era capaz de revertir los cambios en las LLC que recuperaban la morfología globular, pero sólo parcialmente la respuesta de las LLC a quimiotaxis. Por otro lado, se ha comprobado que los efectos terapéuticos de los tratamientos con otros inhibidores como los de las BTK, implican movimientos de ciertas poblaciones celulares entre la sangre y los tejidos linfoides (Ponader y cols., 2012), afianzando el papel de estas moléculas en las interacciones y migración de las LLC. Estos resultados apoyan el posible papel de rutas de señalización activadas por tirosin quinasas en la supervivencia mediada por las interacciones homotípicas entre las células LLC.

5.- RELACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN EphB4-ephrinB2 CON OTRAS RUTAS IMPLICADAS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS LLC. IMPORTANCIA DE LA FAMILIA BAFF

Aunque la señalización bidireccional desencadenada a través de receptor y ligando es el mecanismo de acción mejor estudiado de la familia Eph/ephrin, algunas de las respuestas observadas en determinados contextos celulares podrían explicarse por la relación de estas moléculas con otras moléculas expresadas en la superficie celular. De esta manera, los receptores Eph podrían ejercer su función incluso en ausencia de la interacción con los ligandos ephrin correspondientes. Más aún, una de las hipótesis más aceptadas defiende que la baja intensidad de la señal *forward* junto con la comunicación con otras rutas oncogénicas, puede ser el desencadenante de procesos tumorigénicos (Pasquale, 2008).

Entre los distintos mecanismos descritos, destaca la capacidad de miembros de la familia de receptores del EGF para estimular EphA2 promoviendo la proliferación celular (Larsen y cols., 2007, Brantley-Sieders y cols., 2008) o la asociación y efectos sinérgicos de receptores del factor FGF y EphA4, de forma que el primero induce la fosforilación del receptor Eph impidiendo la unión de ephrinB1 (Arvanitis y cols., 2008, Arvanitis y cols., 2012). Así mismo, otros estudios han revelado la relación con las proteínas de la ruta de señalización Wnt, implicada en la tumorigénesis del cáncer colorrectal, activando tanto la vía canónica como la no-canónica (Batlle y cols., 2005). La e-cadherina es un mediador fundamental en los mecanismos de adhesión intercelular o a componentes de la matriz extracelular. De manera recíproca, los receptores Eph y esta proteína regulan su localización en la superficie celular promoviendo o impidiendo dichas uniones (Cortina y cols., 2007). De manera interesante, también existe una relación recíproca entre los receptores Eph y canales de calcio como los receptores NMDA, ya que EphB2 es capaz de promover su clusterización en las sinapsis mientras que un incremento en la concentración de calcio intracelular induce la degradación proteolítica de EphB2, en ausencia de la interacción de éste con ephrinB1 (Yamaguchi y cols., 2004, Litterst y cols., 2007).

En este trabajo describimos por primera vez la relación entre la familia Eph/ephrin y la supervivencia mediada por miembros de la superfamilia de TNFR. Existen numerosos datos en la bibliografía que apoyan el papel de los ligandos BAFF, APRIL y sus receptores BCMA, BAFF-R y TACI en el desarrollo normal de los linfocitos B y en distintas patologías hematológicas (Rickert y cols., 2011). En la LLC, del mismo modo que en otros trastornos linfoproliferativos como la leucemia linfoblástica aguda (B-ALL) (Maia y cols., 2011), se ha descrito el papel de estas moléculas en el sostenimiento de la supervivencia actuando tanto a través de mecanismos paracrinosis siendo secretadas por distintos componentes del estroma de médula ósea (Nishio y cols., 2005, Cols y cols., 2012) o por vía autocrina puesto que tanto los ligandos como los receptores son expresados por las propias LLC (Kern y cols., 2004).

A pesar de que no hay dudas de que BAFF y APRIL median la supervivencia de las células LLC existen datos contradictorios acerca de la expresión y la de sus receptores en estas células tumorales. Nuestros datos contradicen las afirmaciones de Haiat y cols. y Bojarska-Junak y cols. puesto que no encontramos expresión de BCMA en ninguno de los pacientes de nuestra cohorte (Haiat y cols., 2006, Bojarska-Junak y cols., 2009). En concordancia con los resultados de Novak y cols., detectamos la presencia de BAFF-R y TACI en todas las muestras analizadas, mientras que la expresión del primero era muy elevada en toda la población LLC, TACI se expresaba con menor intensidad y únicamente en un porcentaje variable de la población (Novak y cols., 2002). Otros autores han llegado a la conclusión de que el papel de BCMA en los linfocitos B maduros podría considerarse redundante en muchas situaciones y que su función quedaría restringida prácticamente a la regulación de la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas (O'Connor y cols., 2004). De forma interesante, también confirmamos la expresión de las formas solubles de BAFF y APRIL a nivel intracitoplásmico así como su expresión en membrana en las células LLC (Kern y cols., 2004). En el caso de BAFF, se ha descrito que la forma soluble del ligando es procesada a

partir de la forma de membrana liberándose en forma de trímeros o agrupaciones de éstos hasta 60-mer. Mientras que BAFF-R es capaz de unir las formas multiméricas de BAFF, TACI únicamente reconoce los oligómeros de mayor tamaño o la forma de membrana, así como los homotrímeros de APRIL (Bossen y cols., 2008, Mackay y cols., 2008). La posibilidad de que APRIL se expresase en la superficie celular fue descartada durante mucho tiempo debido a su procesamiento proteolítico en el Golgi. Sin embargo, Maia y cols., describieron la existencia de dos isosformas, APRIL- δ y APRIL- ϵ , expresadas respectivamente en células B-ALL y endoteliales del estroma de médula ósea, generadas por *splicing* alternativo de forma que perdían el sitio de corte de la convertasa y podían ser expresadas en membrana (Maia y cols., 2011). Nuestros resultados sugieren que las células LLC también podrían expresar la isoforma δ .

Aunque tanto en células B de ratón como en linfocitos B humanos en condición sana, sí se ha descrito ampliamente la modulación de la expresión de BAFF y APRIL por señales producidas en el microambiente (Darce y cols., 2007, Tremly y cols., 2007, Crowley y cols., 2009, Guadagnoli y cols., 2011) esta posibilidad no ha sido muy estudiada en la LLC. Algunos autores han mostrado que, a pesar de que tanto la señalización a través del BCR como de CD40L incrementan la expresión de los receptores de BAFF en linfocitos B sanos, en la LLC sólo CD40L induce un incremento en la expresión de TACI pero disminuye la de BCMA y ligeramente la de BAFF-R (Guadagnoli y cols., 2011, Cols y cols., 2012). Nuestros resultados mostraron como la inducción de la señal *reverse* a través de ephrinB2 en las células LLC incrementaba la expresión de TACI en membrana, acompañada de una disminución de la de BAFF-R, y la producción de las formas solubles de BAFF y APRIL, a la vez que potenciaba significativamente la supervivencia *in vitro*. Por el contrario, al generar la señal *forward* a través de EphB4 únicamente observamos un incremento de los ligandos pero la expresión de los receptores permanecía constante. De forma concordante, la supervivencia en esta condición se incrementaba en menor magnitud. Así mismo, comprobamos que no sólo se incrementaba la producción de los ligandos en respuesta a las

señalizaciones pero también su liberación al medio. La adición de formas recombinantes de los receptores al cultivo, en especial de rhTACI, impedía la unión de los ligandos contrarrestando el efecto pro-supervivencia de la señalización Eph/ephrin. Así mismo, tratamientos de bloqueo de los ligandos con las formas recombinantes de los receptores o con anticuerpos contra los ligandos, inhibían los efectos pro-supervivencia de medios condicionados por los co-cultivos de células LLC y BMMSC.

La modulación conjunta de BAFF-R y TACI ha sido descrita en pacientes de inmunodeficiencia común variable, enfermedad caracterizada por altos niveles en el suero de los pacientes de BAFF y APRIL (Barbosa y cols., 2014). Estos autores sugieren que la expresión de los receptores se modula en función de la disponibilidad de BAFF, al encontrar que la concentración de este ligando en suero correlaciona inversamente con la expresión de BAFF-R en individuos sanos y pacientes de CVI, mientras que la expresión de TACI se correlaciona de forma directa con los niveles de BAFF en suero únicamente en los pacientes. De manera interesante muestran cómo la adición de BAFF o del suero de los pacientes de forma exógena al cultivo, inducía la caída en la expresión de BAFF-R en ambos grupos de individuos así como la recuperación de ésta al retirar la citoquina del medio. Al no encontrar modulaciones en la expresión de TACI en respuesta a la presencia de BAFF en donantes sanos, sugieren que la variación de este receptor en los pacientes podría ser un evento secundario debido a la sobre-estimulación de estas células y no deberse directamente a la concentración de BAFF en sangre, aunque ensayos con células B de los pacientes serían necesarios para confirmar esta hipótesis. De forma interesante, muestran que la regulación no tiene lugar a nivel transcripcional sino que la interacción entre receptor y ligando induce la internalización del primero o bien su procesamiento en membrana, originando una forma soluble de BAFF-R que de alguna forma podría regular las altas concentraciones de BAFF en suero.

Además de mostrar la importancia de la familia BAFF en el mecanismo de supervivencia desencadenado por las interacciones entre las propias

células LLC, nuestros resultados muestran que las BMMSC de cultivos primarios y las líneas de estroma, expresan BAFF y APRIL de forma intracitoplásmica así como BAFF en membrana. Además el co-cultivo con linfocitos LLC induce una mayor secreción de los ligandos, en concordancia con otros trabajos que también muestran este efecto en el estroma co-cultivadas con células de linfoma (Lwin y cols., 2009). De forma añadida, indicaron que la señalización *forward* inducida por ephrinB2 expresada por las células LLC en contacto estrecho con las BMMSC, podía ser responsable del incremento en la producción de los ligandos.

En definitiva, nuestros resultados sostenían la posible existencia de una ruta autocrina de supervivencia mediada por BAFF y APRIL en las LLC y confirman la ruta paracrina descrita por otros autores. La presencia de receptores y ligandos en la membrana celular podía sugerir que esta familia de moléculas también estuviese implicada en interacciones homotípicas célula-célula. Sin embargo, los datos disponibles acerca de la afinidad entre receptores y ligandos muestran que el efecto de la forma de membrana de BAFF es mucho mayor en células que expresan BCMA por lo que nos inclinamos por pensar que en la LLC tendrían un mayor efecto las formas solubles de los ligandos.

Con el objeto de comprobar que la inducción de la señal *reverse* incrementaba la afinidad de las células LLC por los ligandos, añadimos de forma exógena rBAFF y rAPRIL a los cultivos de células señalizadas o no mediante EphB4-Fc o ephrinB2-Fc inmovilizadas en placa. Observamos que ambos ligandos potenciaban la viabilidad de las LLC en las que habíamos inducido la señal *reverse* pero no en las que se había potenciado la señal *forward*, de acuerdo a las modulaciones de los receptores observadas. (Kern y cols., 2004) fueron los primeros en sugerir la existencia de una ruta autocrina de supervivencia mediada por BAFF y APRIL en la LLC, mediante este tipo de aproximación experimental. Sin embargo, su estudio muestra una respuesta variable a la presencia de los 2 ligandos, ya que sólo en la mitad de los pacientes se observaba un efecto sinérgico sobre la supervivencia y en algún

caso respondían preferentemente a BAFF, lo que podía explicarse por variaciones en la expresión de sus receptores. De manera interesante, nuestros resultados indicaban que la señalización *reverse* a través de ephrinB2 potenciaba significativamente el efecto conjunto de ambos ligandos, por lo que, dada la ausencia de BCMA, apoyaban la relevancia del papel de TACI, como único receptor capaz de interaccionar con APRIL, en este mecanismo de supervivencia.

Los primeros trabajos sobre TACI resaltaban el papel de esta molécula como posible regulador negativo de la proliferación de los linfocitos B, más que su capacidad para transducir señales pro-supervivencia. Esta conclusión derivaba del análisis de ratones TACI^{-/-} en los que se observaba una clara hiperplasia (Seshasayee y cols., 2003). Sin embargo, las primeras interpretaciones de este resultado sólo tenían en cuenta la forma unida a membrana de este receptor mientras que otros autores habían descrito que el procesamiento del mismo podría dar lugar a una forma soluble que al interaccionar con BAFF soluble impediría sus efectos pro-supervivencia, siendo este el mecanismo de regulación negativa más probable (Schneider y cols., 2001). Otros autores han descartado que esta forma soluble de TACI sea capaz de inducir señalización al interaccionar con las formas de membrana de BAFF y APRIL (Nys y cols., 2013). Por tanto, la pérdida de TACI en el ratón *knockout*, suprimiría tanto la señalización a través de TACI en membrana como los efectos de bloqueo de BAFF de la forma soluble, de acuerdo con el incremento de la disponibilidad de BAFF observado en estos animales. Por otro lado, el papel pro-supervivencia de TACI se encuentra avalado también por su up-regulación en varias líneas celulares de mieloma (Novak y cols., 2004).

La importancia de TACI en la LLC ha ido en ascenso en los últimos años. En concordancia con nuestras observaciones, distintos autores han encontrado la expresión de TACI en las células LLC mostrando un patrón de expresión variable aunque en un bajo porcentaje de células, así como su capacidad de sostener la viabilidad de las LLC a través de su interacción con BAFF y/o APRIL (Kern y cols., 2004, Bojarska-Junak y cols., 2009, Mamara y

cols., 2015). Otros trabajos recientes resaltan la importancia de la interacción entre APRIL y TACI en LLC (Lascano y cols., 2013).

En relación a qué mecanismos se desencadenan tras la interacción de BAFF y APRIL con sus receptores, los datos de la literatura apuntan a la activación constitutiva de la ruta canónica de NF- κ B en la LLC, en contraposición a lo descrito en el caso de los linfocitos B en la condición sana que dependen fundamentalmente de la activación de la ruta alternativa por BAFF (Endo y cols., 2007). Estos autores describen como inhibidores de BAFF-R, que solo activa la ruta alternativa, no contrarrestan la capacidad de BAFF para sostener la supervivencia de las LLC, mientras que si logran frenarla al utilizar inhibidores de BCMA y TACI que activan la ruta canónica. Nuestros resultados son concordantes con este mecanismo propuesto, ya que sólo rhTACI añadido tanto a los cultivos de LLC solas señalizadas a través de Eph/ephrinB y en especial, en co-cultivo con BMMSC, induce una caída en la supervivencia significativa respecto a la condición control. De forma interesante, ni rhBAFF-R ni rhTACI afectaban significativamente la supervivencia de las células LLC cultivadas en ausencia de estimulación. Probablemente debido a la baja disponibilidad de BAFF y APRIL solubles en esta condición, las receptores recombinantes añadidos al cultivo interaccionen con los ligandos expresados en la superficie de las células LLC, pudiendo activar en ellas distintas señalizaciones. Mecanismos similares se han descrito en células de origen mieloide en las que la estimulación de mBAFF y mAPRIL inducía la activación de MAPK y de NF κ B generando una mayor expresión de moléculas pro-inflamatorias (Jeon y cols., 2010, Lee y cols., 2010).

En conclusión, la señalización forward a través de EphB4 y la señalización reverse a través de ephrinB2 son fundamentales al regular la disponibilidad de BAFF y APRIL en el microambiente tumoral. De manera destacada, ephrinB2 desempeña un papel clave al regular la afinidad de las células LLC por los ligandos.

Algunos autores han tratado de encontrar la relación entre la expresión de BAFF-R, TACI, BAFF o APRIL en las células LLC y algunas características clínicas de los pacientes (Bojarska-Junak y cols., 2009, Mamara y cols., 2015). Los resultados que correlacionan el porcentaje de células con expresión de TACI con la expresión de CD38 o ZAP70 son contradictorios entre distintos trabajos por causas desconocidas, aunque posiblemente sea necesaria una mayor cohorte de pacientes para llegar a una conclusión. De manera interesante se ha observado una correlación significativa entre la expresión de este receptor y el intervalo de tiempo transcurrido entre la necesidad de reiniciar tratamiento. En la LLC los niveles de APRIL en suero son mayores que en individuos sanos, de forma opuesta a lo que ocurre con BAFF. Pero además, aquellos pacientes en estadios más avanzados (3-4 Rai modificado) ven incrementados sus niveles de APRIL y el porcentaje de células positivas para la expresión de BAFF y APRIL intracitoplásmicos es significativamente mayor en las muestras ZAP70⁺ o CD38⁺. Así mismo, se ha descrito cierta tendencia de que los pacientes con un mayor porcentaje de células BAFF⁺ presentan una mayor necesidad de recibir tratamiento. Estos datos, además de afianzar el papel de APRIL en la LLC, mostraban otra relación entre esta molécula y ephrinB2, ya que nuestros resultados habían mostrados la asociación de la expresión del ligando de EphB4 con estadios de riesgo avanzados, con pacientes que requerían tratamiento y factores de peor pronóstico como la expresión de ZAP70 o el estado no mutado de IGVH.

Dado que distintos tratamientos contra BAFF y APRIL han sido aprobados recientemente para el tratamiento de distintas enfermedades autoinmunes mediadas por células B, TACI podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de síndromes linfoproliferativos B. Por tanto es fundamental seguir profundizando en el conocimiento de su expresión y función en la LLC.

En definitiva, los resultados de este trabajo proponen una posible organización espacial y temporal del microambiente de médula ósea en la leucemia linfática crónica, en al menos dos nichos funcionalmente distintos en los que la señalización a través de EphB4 y ephrinB2 juega un papel

fundamental. En primer lugar, un nicho dependiente del contacto de BMMSC con una sub-población de células LLC con una expresión elevada de ephrinB2. Esta interacción genera una señal *forward* a través de EphB4 en las BMMSC que lleva a la liberación de factores solubles pro-supervivencia, principalmente BAFF y APRIL, que serían capaces de sostener la supervivencia del clon LLC en los primeros estadios de enfermedad y durante las recidivas post-tratamientos. Una vez que la enfermedad se ha expandido y ha tenido lugar una infiltración masiva en la médula ósea, esta interacción pasaría a tener un papel secundario. De manera que el conjunto de la masa tumoral de células LLC establece su propio microambiente y se sostiene a través de un mecanismo autocrino de supervivencia, mediante interacciones homotípicas que generan una señalización bidireccional a través del contacto entre EphB4 y ephrinB2. Esta interacción también modula la expresión de receptores y ligandos de la familia BAFF en los linfocitos LLC, que regulan la supervivencia (Figura 40).

Muchas de las diferencias observadas en relación con los efectos consecuencia de la interacción Eph/ephrin, puede deberse a las distintas señales generadas en distintos tipos celulares y a su coordinación espacio-temporal. Continuar estudiando la implicación de la actividad de esta familia, más allá de la señalización bidireccional, y su relación con otras rutas de supervivencia es fundamental para su utilización como nuevas dianas terapéuticas.

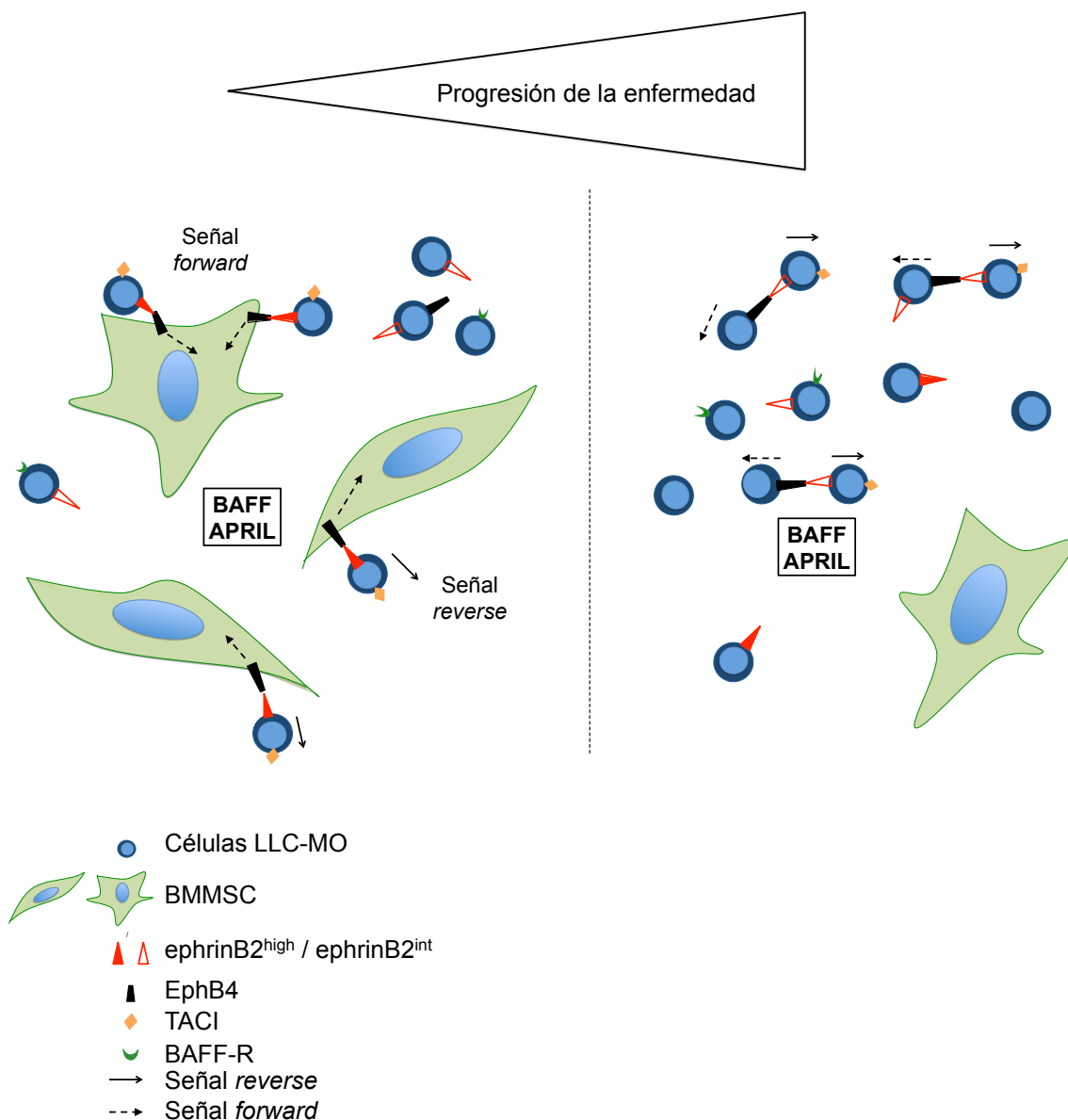


Figura 40. Esquema-resumen de los nichos en los que se divide el microambiente de médula ósea a lo largo del desarrollo de la LLC determinados por distintas interacciones Eph-ephrin. Al inicio de la enfermedad, la viabilidad de las células LLC-MO es claramente dependiente de la interacción de una sub-población ephrinB2^{high} con BMMSC que expresan en su membrana el receptor EphB4 (izquierda). El contacto entre ambos tipos celulares desencadena una señal bidireccional, de forma que la señal *forward* en las células del estroma induce un incremento en la secreción de BAFF y APRIL. Estos ligandos interaccionan principalmente con el receptor TACI, sobre-expresado en las LLC-MO tras la activación de la señal *reverse* a través de ephrinB2. Este mecanismo permite la expansión del clon LLC hasta llegar un punto en el que la infiltración de la médula ósea es masiva y las células LLC sostienen su supervivencia de manera independiente del contacto con el estroma, a través de interacciones homotípicas (derecha). Estas interacciones tienen lugar entre la mayoría de las células LLC con expresión ephrinB2^{int} y que presentan una expresión incrementada de EphB4 en estadios avanzados de la enfermedad. En esta situación la señalización bidireccional promueve el mecanismo de supervivencia autocrino mediado por BAFF y APRIL en las LLC, incrementando la producción de los ligandos y la afinidad de las LLC por los mismos.

CONCLUSIONES

1. El análisis comparativo de la expresión de Eph/ephrin en las células LLC obtenidas de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) mostró la elevada expresión de ephrinB2 en las células leucémicas del compartimento medular, y su sobre-expresión en relación con la expresión en sangre periférica, lo que apunta a un papel específico de este ligando en el nicho de médula ósea.

2. La expresión de Eph/ephrin en las LLC-MO correlaciona con distintas características clínicas. La elevada expresión de los ligandos ephrinB1 y ephrinB2, así como del receptor EphB4, en las células LLC-MO, se asocian con factores de peor pronóstico como ZAP70 o genes IGVH no mutados y con estadios de Rai avanzados. Así mismo, EphrinB1, ephrinB2 y EphA4 se encuentran elevadas en las células LLC de pacientes en los que el patrón de infiltración en médula ósea es nodular.

3. Identificamos una sub-población dentro de las células LLC-MO con niveles muy elevados, aunque constantes, de ephrinB2 en membrana, que presenta características inmunofenotípicas que las diferencian de la población mayoritaria en MO ephrinB2^{int} y de las LLC-SP ephrinB2^{low}. Destacando la elevada expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$, CD44 y una presencia reducida del receptor CXCR4, características compatibles con un fenotipo de retención en médula ósea.

4. Esta sub-población de células LLC-MO ephrinB2^{high}, no expresa el marcador de proliferación Ki67 pero muestra una expresión incrementada de la molécula anti-apoptótica Bcl2, lo que sugiere su implicación en la resistencia a muerte celular programada mediada por fenómenos de adhesión.

5. La expresión de ephrinB2 en las LLC-MO es muy dependiente de señales proporcionadas por otros tipos celulares dentro del microambiente de médula ósea. En particular, la sub-población ephrinB2^{high} sólo se mantiene en cultivo en presencia de VCAM-1, BAFF y APRIL.

Conclusiones

6. Confirmamos que en la LLC el tipo celular mayoritario dentro del estroma de médula ósea está compuesto por células de origen mesenquimal (BMMSC). Estas células presentan una expresión elevada de EphB4 así como de moléculas relacionadas con la supervivencia como CXCL12, BAFF y APRIL, frente a su expresión en BMMSC obtenidas de donantes sanos.

7. El porcentaje de BMMSC EphB4 positivas es mucho mayor en secciones de biopsias de médula ósea con un patrón de infiltración medular y disminuye dramáticamente en las biopsias en las que la infiltración es masiva.

8. Existe una adhesión preferencial de las células ephrinB2^{high} al estroma de médula ósea, mediante un mecanismo que implica la interacción con VCAM-1.

9. El contacto de las células LLC-MO ephrinB2^{high} induce la señal *forward* a través de EphB4 expresada en las BMMSC, que desencadena una mayor liberación de los factores solubles BAFF y APRIL que se acumulan en el microambiente de médula ósea.

10. La interacción con EphB4, activa la señal *reverse* a través de ephrinB2 en las células LLC-MO, aumentando su sensibilidad por BAFF y APRIL al incrementar la expresión del receptor TACI.

11. En estadios avanzados de la enfermedad, las células LLC-MO desarrollan un mecanismo de supervivencia, independiente del contacto con las células del estroma, sustentado por las interacciones homotípicas entre las mismas células leucémicas a través de EphB4 y ephrinB2.

12. Las interacciones homotípicas entre las células LLC-MO activan la ruta autocrina de supervivencia mediada por BAFF y APRIL, de manera que la señal *forward* incrementa la producción de los ligandos y la señal *reverse* induce un aumento en la expresión de TACI.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasheim, H. C., E. Munthe, S. Funderud, E. B. Smeland, K. Beiske and T. Logtenberg** (2000). "A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes." *Blood* **95**(1): 221-230.
- Allen, C. D. and J. G. Cyster** (2008). "Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function." *Semin Immunol* **20**(1): 14-25.
- Alonso-Colmenar, L. M., E. M. Trinidad, B. de Garcillan, M. Ballesteros, M. Castellanos, I. Cotillo, J. J. Munoz and A. G. Zapata** (2009). "Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells." *Leuk Res* **33**(3): 395-406.
- Amigo-Jimenez, I., E. Bailon, N. Aguilera-Montilla, M. J. Terol, J. A. Garcia-Marco and A. Garcia-Pardo** (2015). "Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3Kdelta or PKCbeta signaling pathways." *Oncotarget* **6**(42): 44832-44848.
- Anam, K. and T. A. Davis** (2013). "Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations." *Stem Cell Res Ther* **4**(5): 112.
- Arthur, A., A. Zannettino, R. Panagopoulos, S. A. Koblar, N. A. Sims, C. Stylianou, K. Matsuo and S. Gronthos** (2011). "EphB/ephrin-B interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation." *Bone* **48**(3): 533-542.
- Arvanitis, D. and A. Davy** (2008). "Eph/ephrin signaling: networks." *Genes Dev* **22**(4): 416-429.
- Arvanitis, D. N. and A. Davy** (2012). "Regulation and misregulation of Eph/ephrin expression." *Cell Adh Migr* **6**(2): 131-137.
- Barbosa, R. R., S. L. Silva, S. P. Silva, A. C. Melo, M. C. Pereira-Santos, J. T. Barata, L. Hammarstrom, M. Cascalho and A. E. Sousa** (2014). "Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency." *J Clin Immunol* **34**(5): 573-583.
- Barquilla, A. and E. B. Pasquale** (2015). "Eph receptors and ephrins: therapeutic opportunities." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **55**: 465-487.
- Battle, E., J. Bacani, H. Begthel, S. Jonkheer, A. Gregorieff, M. van de Born, N. Malats, E. Sancho, E. Boon, T. Pawson, S. Gallinger, S. Pals and H. Clevers** (2005). "EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression." *Nature* **435**(7045): 1126-1130.

Batten, M., C. Fletcher, L. G. Ng, J. Groom, J. Wheway, Y. Laabi, X. Xin, P. Schneider, J. Tschopp, C. R. Mackay and F. Mackay (2004). "TNF deficiency fails to protect BAFF transgenic mice against autoimmunity and reveals a predisposition to B cell lymphoma." *J Immunol* **172**(2): 812-822.

Bennett, F., A. Rawstron, M. Plummer, R. de Tute, P. Moreton, A. Jack and P. Hillmen (2007). "B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle." *Br J Haematol* **139**(4): 600-604.

Beyer, M., M. Kochanek, K. Darabi, A. Popov, M. Jensen, E. Endl, P. A. Knolle, R. K. Thomas, M. von Bergwelt-Baildon, S. Debey, M. Hallek and J. L. Schultze (2005). "Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine." *Blood* **106**(6): 2018-2025.

Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguët, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbès and F. Gremy (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis." *Cancer* **48**(1): 198-206.

Boissard, F., J. J. Fournie, C. Laurent, M. Poupot and L. Ysebaert (2015). "Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages." *Leuk Lymphoma* **56**(5): 1570-1572.

Boissard, F., J. J. Fournie, A. Quillet-Mary, L. Ysebaert and M. Poupot (2015). "Nurse-like cells mediate ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia patients." *Blood Cancer J* **5**: e355.

Boissard, F., C. Laurent, A. G. Ramsay, A. Quillet-Mary, J. J. Fournie, M. Poupot and L. Ysebaert (2016). "Nurse-like cells impact on disease progression in chronic lymphocytic leukemia." *Blood Cancer J* **6**: e381.

Bojarska-Junak, A., I. Hus, S. Chocholska, E. Wasik-Szczepanek, M. Sieklucka, A. Dmoszynska and J. Rolinski (2009). "BAFF and APRIL expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with biological and clinical features." *Leuk Res* **33**(10): 1319-1327.

Bossen, C., T. G. Cachero, A. Tardivel, K. Ingold, L. Willen, M. Dobles, M. L. Scott, A. Maquelin, E. Belnoue, C. A. Siegrist, S. Chevrier, H. Acha-Orbea, H. Leung, F. Mackay, J. Tschopp and P. Schneider (2008). "TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts." *Blood* **111**(3): 1004-1012.

Brachtl, G., J. Pinon Hofbauer, R. Greil and T. N. Hartmann (2014). "The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia." *Ann Hematol* **93**(3): 361-374.

Brantley-Sieders, D. M., G. Zhuang, D. Hicks, W. B. Fang, Y. Hwang, J. M. Cates, K. Coffman, D. Jackson, E. Bruckheimer, R. S. Muraoka-Cook and J. Chen (2008). "The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling." *J Clin Invest* **118**(1): 64-78.

Buchner, M., C. Baer, G. Prinz, C. Dierks, M. Burger, T. Zenz, S. Stilgenbauer, H. Jumaa, H. Veelken and K. Ziriklik (2010). "Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **115**(22): 4497-4506.

Buggins, A. G., C. Pepper, P. E. Patten, S. Hewamana, S. Gohil, J. Moorhead, N. Folarin, D. Yallop, N. S. Thomas, G. J. Mufti, C. Fegan and S. Devereux (2010). "Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription." *Cancer Res* **70**(19): 7523-7533.

Burger, J. A. (2011). "Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**: 96-103.

Burger, J. A. (2012). "Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape." *Curr Opin Oncol* **24**(6): 643-649.

Burger, J. A. and T. J. Kipps (2002). "Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells." *Leuk Lymphoma* **43**(3): 461-466.

Burger, J. A., N. Tsukada, M. Burger, N. J. Zvaifler, M. Dell'Aquila and T. J. Kipps (2000). "Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1." *Blood* **96**(8): 2655-2663.

Burger, M., T. Hartmann, M. Krome, J. Rawluk, H. Tamamura, N. Fujii, T. J. Kipps and J. A. Burger (2005). "Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells." *Blood* **106**(5): 1824-1830.

Caligaris-Cappio, F. and P. Ghia (2008). "Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease?" *J Clin Oncol* **26**(27): 4497-4503.

Campas, C., A. M. Cosiáls, M. Barragan, D. Iglesias-Serret, A. F. Santidrian, L. Coll-Mulet, M. de Frias, A. Domingo, G. Pons and J. Gil (2006). "Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells." *Exp Hematol* **34**(12): 1663-1669.

Campioni, D., M. A. Bardi, F. Cavazzini, E. Tammiso, E. Pezzolo, E. Pregnolato, E. Volta, A. Cuneo and F. Lanza (2012). "Cytogenetic and molecular cytogenetic 137

profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in chronic and acute lymphoproliferative disorders." Ann Hematol **91**(10): 1563-1577.

Carrasco, Y. R. (2010). "Molecular and cellular dynamics at the early stages of antigen encounter: the B-cell immunological synapse." Curr Top Microbiol Immunol **340**: 51-62.

Cheema, G. S., V. Roschke, D. M. Hilbert and W. Stohl (2001). "Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases." Arthritis Rheum **44**(6): 1313-1319.

Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13944-13949.

Collins, R. J., L. A. Verschuer, B. V. Harmon, R. L. Prentice, J. H. Pope and J. F. Kerr (1989). "Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro." Br J Haematol **71**(3): 343-350.

Cols, M., C. M. Barra, B. He, I. Puga, W. Xu, A. Chiu, W. Tam, D. M. Knowles, S. R. Dillon, J. P. Leonard, R. R. Furman, K. Chen and A. Cerutti (2012). "Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L." J Immunol **188**(12): 6071-6083.

Cortina, C., S. Palomo-Ponce, M. Iglesias, J. L. Fernandez-Masip, A. Vivancos, G. Whissell, M. Huma, N. Peiro, L. Gallego, S. Jonkheer, A. Davy, J. Lloreta, E. Sancho and E. Batlle (2007). "EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells." Nat Genet **39**(11): 1376-1383.

Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo and E. Montserrat (2003). "ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **348**(18): 1764-1775.

Crowley, J. E., J. E. Stadanlick, J. C. Cambier and M. P. Cancro (2009). "FcγRIIB signals inhibit BLyS signaling and BCR-mediated BLyS receptor up-regulation." Blood **113**(7): 1464-1473.

Darce, J. R., B. K. Arendt, X. Wu and D. F. Jelinek (2007). "Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation." J Immunol **179**(11): 7276-7286.

Davalos, V., H. Dopeso, J. Castano, A. J. Wilson, F. Vilardell, J. Romero-Gimenez, E. Espin, M. Armengol, G. Capella, J. M. Mariadason, L. A. Aaltonen, S.

Schwartz, Jr. and D. Arango (2006). "EPHB4 and survival of colorectal cancer patients." *Cancer Res* **66**(18): 8943-8948.

Deaglio, S., T. Vaisitti, L. Bergui, L. Bonello, A. L. Horenstein, L. Tamagnone, L. Boumsell and F. Malavasi (2005). "CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival." *Blood* **105**(8): 3042-3050.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **8**(4): 315-317.

Dopeso, H., S. Mateo-Lozano, R. Mazzolini, P. Rodrigues, L. Lagares-Tena, J. Ceron, J. Romero, M. Esteves, S. Landolfi, J. Hernandez-Losa, J. Castano, A. J. Wilson, S. Ramon y Cajal, J. M. Mariadason, S. Schwartz, Jr. and D. Arango (2009). "The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis." *Cancer Res* **69**(18): 7430-7438.

El Shikh, M. E., R. M. El Sayed, S. Sukumar, A. K. Szakal and J. G. Tew (2010). "Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells." *Trends Immunol* **31**(6): 205-211.

Endo, T., M. Nishio, T.ENZler, H. B. Cottam, T. Fukuda, D. F. James, M. Karin and T. J. Kipps (2007). "BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway." *Blood* **109**(2): 703-710.

Falivelli, G., E. M. Lisabeth, E. Rubio de la Torre, G. Perez-Tenorio, G. Tosato, O. Salvucci and E. B. Pasquale (2013). "Attenuation of eph receptor kinase activation in cancer cells by coexpressed ephrin ligands." *PLoS One* **8**(11): e81445.

Filip, A. A., B. Cisel and E. Wasik-Szczepanek (2015). "Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes." *Clin Exp Med* **15**(1): 73-83.

Friedberg, J. W., J. Sharman, J. Sweetenham, P. B. Johnston, J. M. Vose, A. Lacasce, J. Schaefer-Cuttillo, S. De Vos, R. Sinha, J. P. Leonard, L. D. Cripe, S. A. Gregory, M. P. Sterba, A. M. Lowe, R. Levy and M. A. Shipp (2010). "Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **115**(13): 2578-2585.

Fuller, T., T. Korff, A. Kilian, G. Dandekar and H. G. Augustin (2003). "Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells." *J Cell Sci* **116**(Pt 12): 2461-2470.

Gaidano, G., R. Foa and R. Dalla-Favera (2012). "Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia." *J Clin Invest* **122**(10): 3432-3438.

Granziero, L., P. Ghia, P. Circosta, D. Gottardi, G. Strola, M. Geuna, L. Montagna, P. Piccoli, M. Chilosi and F. Caligaris-Cappio (2001). "Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **97**(9): 2777-2783.

Guadagnoli, M., F. C. Kimberley, U. Phan, K. Cameron, P. M. Vink, H. Rodermond, E. Eldering, A. P. Kater, H. van Eenennaam and J. P. Medema (2011). "Development and characterization of APRIL antagonistic monoclonal antibodies for treatment of B-cell lymphomas." *Blood* **117**(25): 6856-6865.

Haiat, S., C. Billard, C. Quiney, F. Ajchenbaum-Cymbalista and J. P. Kolb (2006). "Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia." *Immunology* **118**(3): 281-292.

Hallek, M., B. D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M. J. Keating, E. Montserrat, K. R. Rai, T. J. Kipps and L. International Workshop on Chronic Lymphocytic (2008). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines." *Blood* **111**(12): 5446-5456.

Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier and F. K. Stevenson (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **94**(6): 1848-1854.

Hirai, H., Y. Maru, K. Hagiwara, J. Nishida and F. Takaku (1987). "A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene." *Science* **238**(4834): 1717-1720.

Hutchinson, C. V., S. Natarajan, S. M. Johnson, J. A. Adams, K. S. Rees-Unwin and J. Burthem (2014). "Lymphocytes from chronic lymphocytic leukaemia undergo ABL1-linked amoeboid motility and homotypic interaction as an early adaptive change to ex vivo culture." *Exp Hematol Oncol* **3**(1): 7.

Ingold, K., A. Zumsteg, A. Tardivel, B. Huard, Q. G. Steiner, T. G. Cachero, F. Qiang, L. Gorelik, S. L. Kalled, H. Acha-Orbea, P. D. Rennert, J. Tschopp and P. Schneider (2005). "Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners." *J Exp Med* **201**(9): 1375-1383.

Ivanova, N. B., J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore and I. R. Lemischka (2002). "A stem cell molecular signature." *Science* **298**(5593): 601-604.

Jeon, S. T., W. J. Kim, S. M. Lee, M. Y. Lee, S. B. Park, S. H. Lee, I. S. Kim, K. Suk, B. K. Choi, E. M. Choi, B. S. Kwon and W. H. Lee (2010). "Reverse signaling through BAFF differentially regulates the expression of inflammatory mediators and cytoskeletal movements in THP-1 cells." *Immunol Cell Biol* **88**(2): 148-156.

Kern, C., J. F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P. Y. Simonin, S. Feldblum and J. P. Kolb (2004). "Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway." *Blood* **103**(2): 679-688.

Kertesz, N., V. Krasnoperov, R. Reddy, L. Leshanski, S. R. Kumar, S. Zozulya and P. S. Gill (2006). "The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth." *Blood* **107**(6): 2330-2338.

Kikushige, Y. and T. Miyamoto (2015). "Pre-malignant lymphoid cells arise from hematopoietic stem/progenitor cells in chronic lymphocytic leukemia." *Int J Hematol* **102**(5): 528-535.

Kimberley, F. C., L. van Bostelen, K. Cameron, G. Hardenberg, J. A. Marquart, M. Hahne and J. P. Medema (2009). "The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking." *FASEB J* **23**(5): 1584-1595.

Kitada, S., J. Andersen, S. Akar, J. M. Zapata, S. Takayama, S. Krajewski, H. G. Wang, X. Zhang, F. Bullrich, C. M. Croce, K. Rai, J. Hines and J. C. Reed (1998). "Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses." *Blood* **91**(9): 3379-3389.

Kumar, S. R., J. S. Scehnet, E. J. Ley, J. Singh, V. Krasnoperov, R. Liu, P. K. Manchanda, R. D. Ladner, D. Hawes, F. A. Weaver, R. W. Beart, G. Singh, C. Nguyen, M. Kahn and P. S. Gill (2009). "Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression." *Cancer Res* **69**(9): 3736-3745.

Kurtova, A. V., K. Balakrishnan, R. Chen, W. Ding, S. Schnabl, M. P. Quiroga, M. Sivina, W. G. Wierda, Z. Estrov, M. J. Keating, M. Shehata, U. Jager, V. Gandhi, N. E. Kay, W. Plunkett and J. A. Burger (2009). "Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance." *Blood* **114**(20): 4441-4450.

Lagneaux, L., A. Delforge, D. Bron, C. De Bruyn and P. Stryckmans (1998). "Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells." *Blood* **91**(7): 2387-2396.

Lagneaux, L., A. Delforge, C. De Bruyn, M. Bernier and D. Bron (1999). "Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells." *Leuk Lymphoma* **35**(5-6): 445-453.

Larsen, A. B., M. W. Pedersen, M. T. Stockhausen, M. V. Grandal, B. van Deurs and H. S. Poulsen (2007). "Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits

epidermal growth factor-induced cancer cell motility." *Mol Cancer Res* **5**(3): 283-293.

Lascano, V., M. Guadagnoli, J. G. Schot, D. M. Luijks, J. E. Guikema, K. Cameron, M. Hahne, S. Pals, E. Slinger, T. J. Kipps, M. H. van Oers, E. Eldering, J. P. Medema and A. P. Kater (2013). "Chronic lymphocytic leukemia disease progression is accelerated by APRIL-TACI interaction in the TCL1 transgenic mouse model." *Blood* **122**(24): 3960-3963.

Lee, S. M., S. T. Jeon, K. Suk and W. H. Lee (2010). "Macrophages express membrane bound form of APRIL that can generate immunomodulatory signals." *Immunology* **131**(3): 350-356.

Litterst, C., A. Georgakopoulos, J. Shioi, E. Gherzi, T. Wisniewski, R. Wang, A. Ludwig and N. K. Robakis (2007). "Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor." *J Biol Chem* **282**(22): 16155-16163.

Liu, Y., L. Xu, N. Opalka, J. Kappler, H. B. Shu and G. Zhang (2002). "Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands." *Cell* **108**(3): 383-394.

Lopez-Fraga, M., R. Fernandez, J. P. Albar and M. Hahne (2001). "Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase." *EMBO Rep* **2**(10): 945-951.

Lu, Q., E. E. Sun, R. S. Klein and J. G. Flanagan (2001). "Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction." *Cell* **105**(1): 69-79.

Lutzny, G., T. Kocher, M. Schmidt-Supprian, M. Rudelius, L. Klein-Hitpass, A. J. Finch, J. Durig, M. Wagner, C. Haferlach, A. Kohlmann, S. Schnittger, M. Seifert, S. Wanninger, N. Zaborsky, R. Oostendorp, J. Ruland, M. Leitges, T. Kuhnt, Y. Schafer, B. Lampl, C. Peschel, A. Egle and I. Ringshausen (2013). "Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo." *Cancer Cell* **23**(1): 77-92.

Lwin, T., L. A. Crespo, A. Wu, S. Dessureault, H. B. Shu, L. C. Moscinski, E. Sotomayor, W. S. Dalton and J. Tao (2009). "Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis." *Leukemia* **23**(1): 170-177.

Mackay, F. and P. Schneider (2008). "TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(3-4): 263-276.

Mackay, F., S. A. Woodcock, P. Lawton, C. Ambrose, M. Baetscher, P. Schneider, J. Tschopp and J. L. Browning (1999). "Mice transgenic for BAFF develop

lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." *J Exp Med* **190**(11): 1697-1710.

Maffei, R., S. Fiorcari, J. Bulgarelli, S. Martinelli, I. Castelli, S. Deaglio, G. Debbia, M. Fontana, V. Coluccio, G. Bonacorsi, P. Zucchini, F. Narni, G. Torelli, M. Luppi and R. Marasca (2011). "Physical contact with endothelial cells through beta1- and beta2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells." *Haematologica* **97**(6): 952-960.

Maia, S., M. Pelletier, J. Ding, Y. M. Hsu, S. E. Sallan, S. P. Rao, L. M. Nadler and A. A. Cardoso (2011). "Aberrant expression of functional BAFF-system receptors by malignant B-cell precursors impacts leukemia cell survival." *PLoS One* **6**(6): e20787.

Mamara, A., A. E. Germenis, M. Kompoti, M. Palassopoulou, E. Mandala, A. Banti, N. Giannakoulas and M. Speletas (2015). "TACI expression and signaling in chronic lymphocytic leukemia." *J Immunol Res* **2015**: 478753.

Martiny-Baron, G., T. Korff, F. Schaffner, N. Esser, S. Eggstein, D. Marme and H. G. Augustin (2004). "Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4." *Neoplasia* **6**(3): 248-257.

Matsuo, K. and N. Otaki (2012). "Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases." *Cell Adh Migr* **6**(2): 148-156.

Matsuoka, H., H. Obama, M. L. Kelly, T. Matsui and M. Nakamoto (2005). "Biphasic functions of the kinase-defective Ephb6 receptor in cell adhesion and migration." *J Biol Chem* **280**(32): 29355-29363.

Meyer, S., C. Hafner, M. Guba, S. Flegel, E. K. Geissler, B. Becker, G. E. Koehl, E. Orso, M. Landthaler and T. Vogt (2005). "Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells." *Int J Oncol* **27**(5): 1197-1206.

Molica, S., J. C. Reverter, A. Alberti and E. Montserrat (1990). "Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance." *Eur J Haematol* **44**(5): 277-281.

Moreno, A., M. L. Villar, C. Camara, R. Luque, C. Cespon, P. Gonzalez-Porque, G. Roy, J. Lopez-Jimenez, A. Bootello and E. R. Santiago (2001). "Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells." *Blood* **97**(1): 242-249.

Moreno, C. and E. Montserrat (2008). "New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia." *Blood Rev* **22**(4): 211-219.

Morrison, V. A. (2010). "Infectious complications of chronic lymphocytic

leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches." Best Pract Res Clin Haematol **23**(1): 145-153.

Munoz-Fernandez, R., F. J. Blanco, C. Frecha, F. Martin, M. Kimatrai, A. C. Abadia-Molina, J. M. Garcia-Pacheco and E. G. Olivares (2006). "Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts." J Immunol **177**(1): 280-289.

Murray, F., N. Darzentas, A. Hadzidimitriou, G. Tobin, M. Boudjogra, C. Scielzo, N. Laoutaris, K. Karlsson, F. Baran-Marzsak, A. Tsaftaris, C. Moreno, A. Anagnostopoulos, F. Caligaris-Cappio, D. Vaur, C. Ouzounis, C. Belessi, P. Ghia, F. Davi, R. Rosenquist and K. Stamatopoulos (2008). "Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis." Blood **111**(3): 1524-1533.

Nakanishi, H., T. Nakamura, E. Canaani and C. M. Croce (2007). "ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(36): 14442-14447.

Nguyen, T. M., A. Arthur and S. Gronthos (2016). "The role of Eph/ephrin molecules in stromal-hematopoietic interactions." Int J Hematol **103**(2): 145-154.

Nguyen, T. M., A. Arthur, R. Panagopoulos, S. Paton, J. D. Hayball, A. C. Zannettino, L. E. Purton, K. Matsuo and S. Gronthos (2015). "EphB4 Expressing Stromal Cells Exhibit an Enhanced Capacity for Hematopoietic Stem Cell Maintenance." Stem Cells **33**(9): 2838-2849.

Nishio, M., T. Endo, N. Tsukada, J. Ohata, S. Kitada, J. C. Reed, N. J. Zvaifler and T. J. Kipps (2005). "Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha." Blood **106**(3): 1012-1020.

Nitschke, L. (2009). "CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions." Immunol Rev **230**(1): 128-143.

Noren, N. K., G. Foos, C. A. Hauser and E. B. Pasquale (2006). "The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway." Nat Cell Biol **8**(8): 815-825.

Noren, N. K. and E. B. Pasquale (2007). "Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer." Cancer Res **67**(9): 3994-3997.

Novak, A. J., R. J. Bram, N. E. Kay and D. F. Jelinek (2002). "Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival." Blood **100**(8): 2973-2979.

Novak, A. J., J. R. Darce, B. K. Arendt, B. Harder, K. Henderson, W. Kindsvogel, J. A. Gross, P. R. Greipp and D. F. Jelinek (2004). "Expression of BCMA, TACI, and

BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival." Blood **103**(2): 689-694.

Nys, J., C. R. Smulski, A. Tardivel, L. Willen, C. Kowalczyk, O. Donze, B. Huard, H. Hess and P. Schneider (2013). "No evidence that soluble TACI induces signalling via membrane-expressed BAFF and APRIL in myeloid cells." PLoS One **8**(4): e61350.

O'Brien, S. M., D. F. Claxton, M. Crump, S. Faderl, T. Kipps, M. J. Keating, J. Viallet and B. D. Cheson (2009). "Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia." Blood **113**(2): 299-305.

O'Connor, B. P., V. S. Raman, L. D. Erickson, W. J. Cook, L. K. Weaver, C. Ahonen, L. L. Lin, G. T. Mantchev, R. J. Bram and R. J. Noelle (2004). "BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells." J Exp Med **199**(1): 91-98.

Okubo, T., N. Yanai and M. Obinata (2006). "Stromal cells modulate ephrinB2 expression and transmigration of hematopoietic cells." Exp Hematol **34**(3): 330-338.

Paggetti, J., F. Haderk, M. Seiffert, B. Janji, U. Distler, W. Ammerlaan, Y. J. Kim, J. Adam, P. Lichter, E. Solary, G. Berchem and E. Moussay (2015). "Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts." Blood **126**(9): 1106-1117.

Panayiotidis, P., D. Jones, K. Ganeshaguru, L. Foroni and A. V. Hoffbrand (1996). "Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro." Br J Haematol **92**(1): 97-103.

Pangalis, G. A., P. A. Roussou, C. Kittas, C. Mitsoulis-Mentzikoff, P. Matsouka-Alexandridis, N. Anagnostopoulos, I. Rombos and P. Fessas (1984). "Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis." Cancer **54**(4): 702-708.

Pasquale, E. B. (1997). "The Eph family of receptors." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 608-615.

Pasquale, E. B. (2005). "Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 462-475.

Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." Cell **133**(1): 38-52.

Pasquale, E. B. (2010). "Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond." Nat Rev Cancer **10**(3): 165-180.

Pedersen, I. M., S. Kitada, L. M. Leoni, J. M. Zapata, J. G. Karras, N. Tsukada, T. J. Kipps, Y. S. Choi, F. Bennett and J. C. Reed (2002). "Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1." *Blood* **100**(5): 1795-1801.

Pettitt, A. R., E. C. Moran and J. C. Cawley (2001). "Homotypic interactions protect chronic lymphocytic leukaemia cells from spontaneous death in vitro." *Leuk Res* **25**(11): 1003-1012.

Phinney, D. G. and L. Sensebe (2013). "Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts." *Cytotherapy* **15**(2): 140-145.

Plander, M., S. Seegers, P. Ugocsai, S. Diermeier-Daucher, J. Ivanyi, G. Schmitz, F. Hofstadter, S. Schwarz, E. Orso, R. Knuchel and G. Brockhoff (2009). "Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles." *Leukemia* **23**(11): 2118-2128.

Plander, M., P. Ugocsai, S. Seegers, E. Orso, A. Reichle, G. Schmitz, F. Hofstadter and G. Brockhoff (2011). "Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma." *Ann Hematol* **90**(12): 1381-1390.

Poitz, D. M., G. Ende, B. Stutz, A. Augstein, J. Friedrichs, C. Brunssen, C. Werner, R. H. Strasser and S. Jellinghaus (2015). "EphrinB2/EphA4-mediated activation of endothelial cells increases monocyte adhesion." *Mol Immunol* **68**(2 Pt C): 648-656.

Ponader, S., S. S. Chen, J. J. Buggy, K. Balakrishnan, V. Gandhi, W. G. Wierda, M. J. Keating, S. O'Brien, N. Chiorazzi and J. A. Burger (2012). "The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo." *Blood* **119**(5): 1182-1189.

Pontikoglou, C., M. C. Kastrinaki, M. Klaus, C. Kalpadakis, P. Katonis, K. Alpantaki, G. A. Pangalis and H. A. Papadaki (2013). "Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Stem Cells Dev* **22**(9): 1329-1341.

Ponzoni, M., C. Doglioni and F. Caligaris-Cappio (2011). "Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment." *Semin Diagn Pathol* **28**(2): 161-166.

Purroy, N., P. Abrisqueta, J. Carabia, C. Carpio, C. Palacio, F. Bosch and M. Crespo (2015). "Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo." *Oncotarget* **6**(10): 7632-7643.

Rai, K. R. and T. Han (1990). "Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia." *Hematol Oncol Clin North Am* **4**(2): 447-456.

Rai, K. R., A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy and B. S. Pasternack (1975). "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **46**(2): 219-234.

Ramsay, A. G., A. J. Johnson, A. M. Lee, G. Gorgun, R. Le Dieu, W. Blum, J. C. Byrd and J. G. Gribben (2008). "Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug." *J Clin Invest* **118**(7): 2427-2437.

Rickert, R. C., J. Jellusova and A. V. Miletic (2011). "Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease." *Immunol Rev* **244**(1): 115-133.

Rozman, C., E. Montserrat, J. M. Rodriguez-Fernandez, R. Ayats, T. Vallespi, R. Parody, A. Rios, D. Prados, M. Morey, F. Gomis and et al. (1984). "Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases." *Blood* **64**(3): 642-648.

Ruan, J., E. Hyjek, P. Kermani, P. J. Christos, A. T. Hooper, M. Coleman, B. Hempstead, J. P. Leonard, A. Chadburn and S. Raffi (2006). "Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma." *Clin Cancer Res* **12**(19): 5622-5631.

Schmid, C. and P. G. Isaacson (1994). "Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study." *Histopathology* **24**(5): 445-451.

Schneider, P., H. Takatsuka, A. Wilson, F. Mackay, A. Tardivel, S. Lens, T. G. Cachero, D. Finke, F. Beermann and J. Tschopp (2001). "Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen." *J Exp Med* **194**(11): 1691-1697.

Schrottner, P., M. Leick and M. Burger (2009). "The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact." *Ann Hematol* **89**(5): 437-446.

Seshasayee, D., P. Valdez, M. Yan, V. M. Dixit, D. Tumas and I. S. Grewal (2003). "Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor." *Immunity* **18**(2): 279-288.

Shalapour, S., J. Hof, R. Kirschner-Schwabe, L. Bastian, C. Eckert, J. Prada, G. Henze, A. von Stackelberg and K. Seeger (2011). "High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse." *Haematologica* **96**(11): 1627-1635.

Smith, S. H. and M. P. Cancro (2003). "Cutting edge: B cell receptor signals regulate BlyS receptor levels in mature B cells and their immediate progenitors." *J Immunol* **170**(12): 5820-5823.

Soma, L. A., F. E. Craig and S. H. Swerdlow (2006). "The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma." *Hum Pathol* **37**(2): 152-159.

Stamatopoulos, K., C. Belessi, C. Moreno, M. Boudjograh, G. Guida, T. Smilevska, L. Belhoul, S. Stella, N. Stavroyianni, M. Crespo, A. Hadzidimitriou, L. Sutton, F. Bosch, N. Laoutaris, A. Anagnostopoulos, E. Montserrat, A. Fassas, G. Dighiero, F. Caligaris-Cappio, H. Merle-Beral, P. Ghia and F. Davi (2007). "Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations." *Blood* **109**(1): 259-270.

Stankovic, T., P. Weber, G. Stewart, T. Bedenham, J. Murray, P. J. Byrd, P. A. Moss and A. M. Taylor (1999). "Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia." *Lancet* **353**(9146): 26-29.

Suenobu, S., N. Takakura, T. Inada, Y. Yamada, H. Yuasa, X. Q. Zhang, S. Sakano, Y. Oike and T. Suda (2002). "A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(3): 1124-1131.

Ting, M. J., B. W. Day, M. D. Spanevello and A. W. Boyd (2010). "Activation of ephrin A proteins influences hematopoietic stem cell adhesion and trafficking patterns." *Exp Hematol* **38**(11): 1087-1098.

Treml, L. S., G. Carlesso, K. L. Hoek, J. E. Stadanlick, T. Kambayashi, R. J. Bram, M. P. Cancro and W. N. Khan (2007). "TLR stimulation modifies BlyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells." *J Immunol* **178**(12): 7531-7539.

Trimarco, V., E. Ave, M. Facco, G. Chiodin, F. Frezzato, V. Martini, C. Gattazzo, F. Lessi, C. A. Giorgi, A. Visentin, M. Castelli, F. Severin, R. Zambello, F. Piazza, G. Semenzato and L. Trentin (2015). "Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival." *Oncotarget* **6**(39): 42130-42149.

Trinidad, E. M., M. Ballesteros, J. Zuloaga, A. Zapata and L. M. Alonso-Colmenar (2009). "An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression." *Blood* **114**(24): 5081-5090.

Trinidad, E. M., A. G. Zapata and L. M. Alonso-Colmenar (2010). "Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration." *Cell Adh Migr* **4**(3): 363-367.

Tsukada, N., J. A. Burger, N. J. Zvaifler and T. J. Kipps (2002). "Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **99**(3): 1030-1037.

Vega, F., L. J. Medeiros, W. H. Lang, A. Mansoor, C. Bueso-Ramos and D. Jones (2002). "The stromal composition of malignant lymphoid aggregates in bone marrow: variations in architecture and phenotype in different B-cell tumours." *Br J Haematol* **117**(3): 569-576.

Vela, C. M., A. McBride, S. M. Jaglowski and L. A. Andritsos (2016). "Ibrutinib for treatment of chronic lymphocytic leukemia." *Am J Health Syst Pharm* **73**(6): 367-375.

Vincent, A. M., J. C. Cawley and J. Burthem (1996). "Integrin function in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **87**(11): 4780-4788.

Vincent, F. B., D. Saulep-Easton, W. A. Figgett, K. A. Fairfax and F. Mackay (2013). "The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity." *Cytokine Growth Factor Rev* **24**(3): 203-215.

Wang, Y., A. Menendez, C. Fong, H. Z. ElAlieh, W. Chang and D. D. Bikle (2014). "Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation." *J Bone Miner Res* **29**(8): 1900-1913.

Ware, C. F. and J. R. Sedy (2011). "TNF Superfamily Networks: bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14)." *Curr Opin Immunol* **23**(5): 627-631.

Yamaguchi, Y. and E. B. Pasquale (2004). "Eph receptors in the adult brain." *Curr Opin Neurobiol* **14**(3): 288-296.

Yaron, A. and D. Sprinzak (2012). "The cis side of juxtacrine signaling: a new role in the development of the nervous system." *Trends Neurosci* **35**(4): 230-239.

Yu, G., H. Luo, Y. Wu and J. Wu (2003). "Ephrin B2 induces T cell costimulation." *J Immunol* **171**(1): 106-114.

Yuan, K., T. M. Hong, J. J. Chen, W. H. Tsai and M. T. Lin (2004). "Syndecan-1 up-regulated by ephrinB2/EphB4 plays dual roles in inflammatory angiogenesis." *Blood* **104**(4): 1025-1033.

Zamora, D. O., B. Babra, Y. Pan, S. R. Planck and J. T. Rosenbaum (2006). "Human leukocytes express ephrinB2 which activates microvascular endothelial cells." *Cell Immunol* **242**(2): 99-109.

Zenz, T., D. Mertens, R. Kuppers, H. Dohner and S. Stilgenbauer (2010). "From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia." *Nat Rev Cancer* **10**(1): 37-50.

Zhao, C., N. Irie, Y. Takada, K. Shimoda, T. Miyamoto, T. Nishiwaki, T. Suda and K. Matsuo (2006). "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis." Cell Metab **4**(2): 111-121.

Zhao, S., R. Wehner, M. Bornhauser, R. Wassmuth, M. Bachmann and M. Schmitz (2010). "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders." Stem Cells Dev **19**(5): 607-614.

SUMMARY

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in adults in western countries. It is characterized by the accumulation of leukemia cells in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) and, to a varying extent, lymph nodes (LN) and spleen (SP) (Moreno and Montserrat 2008). CLL cells characteristically express CD5, a T-cell related antigen, along with CD19 and CD23 antigens and low levels of CD20 but lack expression of CD10 in contrast to mantle cell lymphomas. In addition, these cells express low levels of surface immunoglobulins, usually IgM and/or IgD. Bone marrow (BM) infiltration occurs in all patients at diagnosis and in most cases represents > 30% of the cellularity (Hallek, Cheson et al. 2008). The pattern of infiltration can be nodal, interstitial, diffuse or a mixed one which can be associated with different prognosis (Rozman, Montserrat et al. 1984).

In contrast to other lymphoproliferative disorders, there is not a CLL-specific genomic aberration responsible of its development. However, most patients present genomic aberrations in the CLL cells, including but not limited to del13q, del11q, Trisomy 12 and/or del17p13, which influence clinical management and drug response. The disease is usually detected as an increased lymphocyte count in PB without further symptoms. However, the clinical course of CLL patients is extremely heterogeneous from patients who never require treatment, some that has to be treated at different time points after diagnosis and the worst prognosis group that develop anemia, thrombocytopenia, bulky lymphadenopathies and/or splenomegaly at short time since diagnosis and reduced life expectancy. Despite the new treatments that induce disease remission in most of the cases, CLL still remains an incurable disease. Indeed, nowadays there are not prognostic factors able to discriminate CLL patients who will eventually progress, at diagnosis. Currently, the modified Rai staging system (Rai and Han 1990) and lymphocyte doubling time (Molica, Reverter et al. 1990) are the most widely applied prognostic factors. New biological parameters, like expression of CD38, CD49d (Brachtl, Pinon Hofbauer et al. 2014) and ZAP70 (Crespo, Bosch et al. 2003) had arisen in the

last year as independent prognosis factors. Among them, the mutational status of IGVH genes in CLL cells themselves is currently the most robust predictor, unmutated cases associating with the worst clinical outcome (Hamblin, Davis et al. 1999).

CLL cells accumulating in the tissues show resistance to programmed cell death. However, their inability to survive *in vitro* implies that extrinsic signals from the microenvironment play an important role in CLL pathogenesis (Collins, Verschuer et al. 1989). Growing evidence suggests that CLL cells are protected from spontaneous apoptosis and from conventional chemotherapy within tissue microenvironments such as the bone marrow and secondary lymphoid organs, which can pave the way to clonal evolution and relapses (Burger 2011). Whether direct physical contacts, between leukemia cells themselves and/or with other cell lineages, and/or secreted factors are responsible for the maintenance of CLL viability needs to be further clarified. Malignant B cells themselves may contribute to the creation of their own nurturing milieu, modifying the properties of different cellular members of bone marrow stroma in the process of tissue infiltration (Plander, Ugocsai et al. 2011). As such, disrupting the crosstalk between leukemia cells and their surrounding milieu is an attractive therapeutic strategy (Burger 2012).

In CLL, previous studies have shown that different non-hematopoietic adherent cell types from BM, collectively referred to as stromal cells (BMSC), can protect CLL cells from spontaneous and drug mediated apoptosis *in vitro* (Lagneaux, Delforge et al. 1999) suggesting that they could play a similar role in the CLL microenvironment. The predominant stromal cell population in CLL BM is related to the mesenchymal lineage (Kurtova, Balakrishnan et al. 2009) which is in contrast to other B-cell lymphomas, particularly high-grade lymphomas, which harbor larger numbers of CD68 hemangiogenic cells (Ruan, Hyjek et al. 2006).

The Eph receptor family of tyrosine kinases and their ephrin ligands develop their function through physical interactions that can mediate adhesion

or repulsion between cell types, affecting in many instances cell survival and/or proliferation (Pasquale 2010). Previous results from our group had identified members in the CLL cells isolated from peripheral blood (Alonso-Colmenar, Trinidad et al. 2009), which nonetheless could play a role within BM interactions. Moreover, the comparative analysis between their expression in CLL cells from PB and BM could provide new insights to the clinical of CLL. Growing number of studies support a role of Eph/ephrin interactions, particularly the tandem EphB4-ephrinB2, in normal BM including hematopoiesis and bone remodeling (Anam and Davis 2013, Wang, Menendez et al. 2014, Nguyen, Arthur et al. 2015) further pointing to a possible role in the establishment and/or maintenance of BM leukemia niches. Indeed, they are likely candidates to mediate in the already recognized cell-adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) provided by BMMSC. Since Eph/ephrin interactions can result in bi-directional signaling, which is referred to as *forward* into the receptor-expressing cell and *reverse* into the ligand expressing one, cell autonomous and non-autonomous roles should be clearly distinguished in order to block the most relevant one. Indeed, Eph/ephrin interactions can act as tumor suppressors or promoters (Pasquale 2010) raising their importance of a precise characterization of their action.

The role of members of the tumor necrosis (TNF) superfamily in CLL is increasingly relevant. Specially, BAFF and APRIL ligands and their receptors BAFF-R, TACI and BCMA have important function in normal B-cell biology (Rickert, Jellusova et al. 2011) and their dysregulation leads to autoimmune or lymphoproliferative disorders (Cheema, Roschke et al. 2001, Batten, Fletcher et al. 2004). Different authors have raised an important role in CLL, sustaining leukemia cells viability in a paracrine and probably autocrine fashions (Kern, Cornuel et al. 2004, Pontikoglou, Kastrinaki et al. 2013).

Objectives

- ✓ To analyze the expression of the Eph/ephrin family in CLL cells obtained from samples of peripheral blood and bone marrow aspirates, in order to determine their relationship to tissue localization, disease staging or clinical outcome as well as their associations with prognostic factors like IGVH mutational status or ZAP70 expression.
- ✓ To characterized the cell types that compound the bone marrow microenvironment in CLL, relative to the ones present in healthy subjects, and their expression of Eph/ephrin molecules.
- ✓ To determine which Eph/ephrin interactions and signaling are involved in the resistance to spontaneous or drug induced apoptosis.
- ✓ To determine whether Eph/ephrin interactions sustain CLL survival through cross-talk with other pathways having recognized roles in this disease like integrin's interactions, BCR/CD40 cross-linking or BAFF/APRIL production.

Results and discussion

The analysis of Eph/ephrin mRNAs abundances, in CLL cells from peripheral blood and bone marrow showed that ephrinB2 was the main member of this family expressed by BM-CLL cells and more over that it was the only one over-expressed in this compartment relative to the peripheral blood one. Significantly, increased expression of ephrinB1 and ephrinB2 associates with samples presenting unmutated (UM) IGVH genes and ZAP70 positivity. EphB4 followed the same tendency. EphrinB1 and ephrinB2 ligands, as well as the receptors EphB4 y EphB6 were increased at advanced Rai stages. Moreover, the expression of both ligands was elevated in patients presenting a nodal or interstitial infiltration pattern, the same as EphB4. These data suggest that the

members of Eph/ephrin B subfamily could play distinct roles at different moments of disease progression pointing to the interaction between EphB4 and ephrinB2 as mediating in the establishment of the CLL related BM microenvironment.

Flow cytometry analyses confirmed the qRT-PCR results and indeed showed the existence of a minor subset of BM-CLL cells with constant but higher levels of ephrinB2 (ephrinB2^{hi}). The proportion of ephrinB2^{hi} cells inversely correlated with the degree of BM infiltration and significantly decreased in BM having a massive/diffuse pattern of infiltration. Moreover, its proportion in the BM samples significantly associated with poor prognostic markers including positivity for ZAP-70 or IGVH unmutated (UM) cases. This subset showed distinctive immunophenotype characteristics as compared to the major BM-CLL population. Accordingly, we referred to them as ephrinB2 intermediate (ephrinB2^{int}) and high (ephrinB2^{high}) expressing populations in the BM and as ephrinB2 low (ephrinB2^{low}) to that in the PB. Interestingly, ephrinB2^{high} cells differed from the bulk of CLL cells in BM (ephrinB2^{int}) and those from the PB (ephrinB2^{low}) in expression of several molecules that can be associated with adhesion dependent drug resistance. Thus, ephrinB2^{high} had increased expression of $\alpha 4$, αL and the corresponding $\beta 2$ and $\beta 1$ integrin chains and of CD44 as well and a decreased expression of CXCR4 which could be compatible with a BM retention phenotype. Surprisingly, ephrinB2^{high} cells lacked expression of the proliferation marker Ki67, discarding them as a proliferating pool, but more likely associating with increased capability to apoptosis resistance due to their increased expression of Bcl-2.

On the basis of these results, CLL cells from BM or PB were cultured in the presence of different molecules related to their survival within the microenvironment. The CLL cells from both tissue compartments showed improved viabilities in the presence of CXCL12 or BAFF/APRIL ligands while only BM samples were rescued by fibronectin or integrin ligands followed by varying degrees of elevated ephrinB2 expression compared to its falls upon the control culture conditions without any stimuli. Moreover, we found that

Summary

ephrinB2^{high} cells of BM samples were only present after culture onto VCAM-1 or through BAFF/APRIL highlighting that this CLL subset and/or phenotype, in contrast to the bulk of ephrinB2^{int} CLL cells in BM, suggesting that they could be more dependent on adhesive interactions with other cell lineages.

BM-CLL cells aggregates were observed after several days culture. Confocal microscopy images show that ephrinB2 accumulated in BM-CLL cell contact sites but not in the PB-CLL cells. Moreover, siRNA mediated silencing of ephrinB2 in CLL cells led to a significant drop in cell viability in cultures without further stimuli. These results suggested a role of homotypic interactions between CLL cells in survival within the bone marrow niche and the relevance of ephrinB2 *reverse* signaling. In addition, we determined that plate bound ephrinB2Fc and to a lower extent the recombinant receptor EphB4, increased the intracellular levels of BAFF/APRIL in the CLL cells relative to untreated or Fc-only cultures while EphB4Fc rather than ephrinB2Fc mediated major changes in cell surface expressed BAFF-R or TACI, downregulating the former followed by upregulation of the later. Together, these results supported an ephrinB2 dependent BAFF/APRIL and TACI dependent survival route. Accordingly, addition of soluble BAFF-R or TACI decoy receptors markedly reduced the viability of CLL cells cultured onto plate bound ephrinB2Fc or EphB4Fc. Besides, in concert with ephrinB2 mediated BAFF-R/TACI changes, plate bound EphB4Fc but not ephrinB2Fc dramatically enhanced BAFF, APRIL or their combination mediated survival of CLL cells. Moreover, plate bound EphB4 dramatically enhanced CLL cells resistance to Fludarabine (F), Mafosfamide (M), Bendamustine (B) and Chlorambucil (C) mediated by BAFF and/or APRIL, further highlighting a critical role of ephrinB2 in drug resistance within BM.

Characterization of BMSC derived from BM cultures of CLL patients or healthy subjects showed a major population of adherent cells expressing previously described markers of mesenchymal origin. However, CLL-BMSC over-expressed survival related molecules like VCAM-1, BAFF, APRIL, and CXCL12, probably due to the presence of CLL cells during the culture

expansion, that could modified their properties. More importantly, CLL-BMMSC showed increased expression of EphB4, similar to the levels found in Hs27 bone marrow stromal cell line, but higher than those found in healthy-BMMSC or in the Hs5 cell line.

Human bone marrow stromal cell lines Hs5 and Hs27 were employed to assess CLL cells binding ability to BMMSC. Our results show a preferential adhesion of ephrinB2^{high} BM-CLL cells to stromal cells. Interestingly, the percentage of conjugates with TNF stimulated Hs27 cells was markedly reduced in the case of EphB4Fc pre-incubated CLL cells while, on the contrary, it was markedly increased when ephrinB2Fc pre-incubated TNF-HS27 cells were used, suggesting that ephrinB2 mediated EphB4 *forward* signaling into stromal cells enhanced adhesion between both cell types. Comparison between direct co-culture conditions or filter-separate cultures of CLL cells and BMSCLS showed the relevance of cell-to-cell contact in the survival mechanisms. To determine the role of this interaction in stromal mediated survival, EphB4 or ephrinB2 were knock-down in the stromal cell lines or CLL cells, respectively, using specific siRNA molecules. Accordingly, silenced ephrinB2 or EphB4 in the corresponding cell types led to a decrease in viability of direct co-cultures but not in the filter separated ones, further pointing to a major role of direct interactions between both cell types in the survival outcomes.

The possibility that interactions between CLL cells and BMMSC lead to an increase of soluble survival factors was checked in experiments in which CLL cells were cultured with conditioned media derived from cultures of Hs27 cells stimulated with ephrinB2-Fc or with ephrinB2^{high} CLL cells. Conditioned media from both situations increased the viability of CLL cells supporting that ephrinB2 mediated *forward* signaling in BMMSC stimulates the release of soluble factors. Interestingly protective effects of condition medium from ephrinB2^{high}-Hs27 cocultures were largely inhibited when soluble BAFF-R or TACI decoy receptors, as well as anti-BAFF and anti-APRIL blocking antibodies were added, definitively demonstrating that EphB4-ephrinB2 interactions promote BAFF/APRIL survival effects.

Conclusions

We have identified a new CLL subset housing in the BM niche, which expresses distinctly high ephrinB2 levels on the cell surface expression along with other immunophenotypic characteristics differing from the bulk of leukemia cells within the BM. Moreover, our results are compatible with a role of EphB4 in this leukemia, since its role in normal hematopoiesis is being increasingly recognized.

Herein we show that ephrinB2-EphB4 interaction could sustain CLL cells within BM niches through the TNF family signaling pathways that has been related with the survival and drug resistance of CLL cells. Our present findings support a possible spatial organization of the CLL microenvironment into, at least, two functional niches. Firstly, a BMMSC dependent niche sustained by an adherent CLL subpopulation strongly expressing ephrinB2. In this niche, EphB4 *forward* signaling in BMMSC, induced the release of soluble factors, mainly BAFF/APRIL, within the BM microenvironment, which possibly sustains the major pool of leukemia cells at early stages and/or after therapy. Once a massive infiltration is established, the bulk of leukemic cells establish its own autocrine survival microenvironment through homotypic interactions mainly regulated by ephrinB2 *reverse* signaling, which also involves BAFF/APRIL autocrine pathway.

This tandem of molecules appears to be a promising new target in the aim to disrupt the CLL microenvironment.

Alonso-Colmenar, L. M., E. M. Trinidad, B. de Garcillan, M. Ballesteros, M. Castellanos, I. Cotillo, J. J. Munoz and A. G. Zapata (2009). "Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells." Leuk Res **33**(3): 395-406.

Anam, K. and T. A. Davis (2013). "Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations." Stem Cell Res Ther **4**(5): 112.

Batten, M., C. Fletcher, L. G. Ng, J. Groom, J. Wheway, Y. Laabi, X. Xin, P. Schneider, J. Tschopp, C. R. Mackay and F. Mackay (2004). "TNF deficiency fails to protect BAFF transgenic mice against autoimmunity and reveals a predisposition to B cell lymphoma." J Immunol **172**(2): 812-822.

Brachtl, G., J. Pinon Hofbauer, R. Greil and T. N. Hartmann (2014). "The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia." Ann Hematol **93**(3): 361-374.

Burger, J. A. (2011). "Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2011**: 96-103.

Burger, J. A. (2012). "Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape." Curr Opin Oncol **24**(6): 643-649.

Cheema, G. S., V. Roschke, D. M. Hilbert and W. Stohl (2001). "Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases." Arthritis Rheum **44**(6): 1313-1319.

Collins, R. J., L. A. Verschuer, B. V. Harmon, R. L. Prentice, J. H. Pope and J. F. Kerr (1989). "Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro." Br J Haematol **71**(3): 343-350.

Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo and E. Montserrat (2003). "ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **348**(18): 1764-1775.

Hallek, M., B. D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M. J. Keating, E. Montserrat, K. R. Rai, T. J. Kipps and L. International Workshop on Chronic Lymphocytic (2008). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines." Blood **111**(12): 5446-5456.

Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier and F. K. Stevenson (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia." Blood **94**(6): 1848-1854.

Kern, C., J. F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P. Y. Simonin, S. Feldblum and J. P. Kolb (2004). "Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway." Blood **103**(2): 679-688.

Kurtova, A. V., K. Balakrishnan, R. Chen, W. Ding, S. Schnabl, M. P. Quiroga, M. Sivina, W. G. Wierda, Z. Estrov, M. J. Keating, M. Shehata, U. Jager, V. Gandhi, N. E. Kay, W. Plunkett and J. A. Burger (2009). "Diverse marrow stromal cells protect CLL

Summary

cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance." Blood **114**(20): 4441-4450.

Lagneaux, L., A. Delforge, C. De Bruyn, M. Bernier and D. Bron (1999). "Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells." Leuk Lymphoma **35**(5-6): 445-453.

Molica, S., J. C. Reverter, A. Alberti and E. Montserrat (1990). "Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance." Eur J Haematol **44**(5): 277-281.

Moreno, C. and E. Montserrat (2008). "New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia." Blood Rev **22**(4): 211-219.

Nguyen, T. M., A. Arthur, R. Panagopoulos, S. Paton, J. D. Hayball, A. C. Zannettino, L. E. Purton, K. Matsuo and S. Gronthos (2015). "EphB4 Expressing Stromal Cells Exhibit an Enhanced Capacity for Hematopoietic Stem Cell Maintenance." Stem Cells **33**(9): 2838-2849.

Pasquale, E. B. (2010). "Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond." Nat Rev Cancer **10**(3): 165-180.

Plander, M., P. Ugocsai, S. Seegers, E. Orso, A. Reichle, G. Schmitz, F. Hofstadter and G. Brockhoff (2011). "Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma." Ann Hematol **90**(12): 1381-1390.

Pontikoglou, C., M. C. Kastrinaki, M. Klaus, C. Kalpadakis, P. Katonis, K. Alpantaki, G. A. Pangalis and H. A. Papadaki (2013). "Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia." Stem Cells Dev **22**(9): 1329-1341.

Rai, K. R. and T. Han (1990). "Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia." Hematol Oncol Clin North Am **4**(2): 447-456.

Rickert, R. C., J. Jellusova and A. V. Miletic (2011). "Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease." Immunol Rev **244**(1): 115-133.

Rozman, C., E. Montserrat, J. M. Rodriguez-Fernandez, R. Ayats, T. Vallespi, R. Parody, A. Rios, D. Prados, M. Morey, F. Gomis and et al. (1984). "Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases." Blood **64**(3): 642-648.

Ruan, J., E. Hyjek, P. Kermani, P. J. Christos, A. T. Hooper, M. Coleman, B. Hempstead, J. P. Leonard, A. Chadburn and S. Rafii (2006). "Magnitude of stromal

hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma." Clin Cancer Res **12**(19): 5622-5631.

Wang, Y., A. Menendez, C. Fong, H. Z. ElAlieh, W. Chang and D. D. Bikle (2014). "Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation." J Bone Miner Res **29**(8): 1900-1913.

RESUMEN

Introducción

La leucemia linfática crónica (LLC) es el síndrome proliferativo más común en el mundo occidental. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de linfocitos B maduros en sangre periférica (SP), médula ósea (MO), ganglios linfáticos (GL) y bazo (B) (Moreno y cols., 2008). Las células LLC expresan de forma característica CD5, antígeno relacionado con células T, junto con CD19 y CD23. Mientras que sus niveles de CD20 son bajos y carecen de la expresión de CD10, lo que permite diferenciarlas de las células del linfoma del manto. Así mismo, sus niveles de inmunoglobulinas en la superficie celular son muy bajos, normalmente sólo IgM y/o IgD. La infiltración de médula ósea ocurre en todos los pacientes desde el inicio de la patología, llegando a representar más de un 30% de la celularidad (Hallek y cols., 2008). El patrón de infiltración varía desde nodal o intersticial a difuso, o una condición mixta, asociando con distinto pronóstico (Rozman y cols., 1984).

Al contrario que en otros síndromes linfoproliferativos, no existe una alteración genómica responsable del desencadenamiento de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los pacientes de LLC presentan mutaciones en su genoma, incluyendo del13q, del11q, Trisomía del 12 y /o del17p13, que es capaz de influir el manejo clínico de los enfermos y la respuesta a tratamientos. La enfermedad se detecta en la mayoría de los casos por un incremento en la carga linfocitaria en sangre periférica, sin otros síntomas relevantes. Sin embargo, la evolución de los pacientes es extremadamente heterogénea, existiendo pacientes que nunca requieren tratamiento, otros que precisan ser tratados en distintos momentos de la enfermedad y un grupo con peor pronóstico que desarrolla anemia, trombocitopenia, linfadenopatías y/o esplenomegalia y presentan una reducida esperanza de vida. A pesar de que los nuevos tratamientos son capaces de reducir la remisión de la enfermedad en la mayoría de los casos, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable. Actualmente el sistema de estadios de Rai modificado (Rai y cols., 1990) y el tiempo necesario para la duplicación de la linfocitosis (Molica y cols., 1990) son los factores pronóstico más aplicados. Nuevos parámetros biológicos, como la

expresión de CD38, CD49d (Brachtl y cols., 2014) y ZAP70 (Crespo y cols., 2003) han surgido en los últimos años como factores pronóstico independientes. Por encima de todos ellos, el estado mutacional de los genes IGVH en las células LLC, es actualmente el más aceptado, dado que los pacientes con ausencia de mutación presentan peor evolución clínica (Hamblin y cols., 1999).

Las células LLC se acumulan en los tejidos debido a su resistencia frente a mecanismos de muerte celular programada. Sin embargo, su incapacidad para sobrevivir en condiciones *in vitro*, destaca la importancia de señales externas proporcionadas por el microambiente en la patogenia de la LLC (Collins y cols., 1989). Cada vez más evidencias sugieren que las células LLC se encuentran protegidas de la apoptosis espontánea y de los tratamientos quimioterapéuticos tradicionales, en el microambiente de médula ósea o en los órganos linfoides secundarios, lo que puede facilitar tanto la evolución clonal de la enfermedad como las recidivas (Burger, 2011). Si estos procesos son dependientes del contacto directo con los tipos celulares que conforman el estroma o de factores solubles secretados, necesita ser analizado en profundidad. Las propias células leucémicas serían capaces de modificar el microambiente en su favor, alterando las propiedades de los componentes del estroma en el proceso de infiltración (Plander y cols., 2011). Por todo ello, tratar de bloquear las interacciones entre las células LLC y su entorno es una nueva estrategia terapéutica muy interesante (Burger, 2012).

En la LLC, distintos trabajos han mostrado que distintos tipos celulares, englobados bajo la denominación de células estromales (BMSC, del inglés), pueden proteger a las células leucémicas de la apoptosis espontánea o inducida por fármacos, *in vitro* (Lagneaux y cols., 1999), sugiriendo que podrían tener un papel en el microambiente la LLC. Entre todos ellos, la población predominante se encuentra ligada al linaje mesenquimal (Kurtova y cols., 2009), al contrario que en otros linfomas de células B, en los que se encuentra

un gran número de células hematopoyéticas CD68 positivas (Ruan y cols., 2006).

La familia de receptores tirosin-quinasa Eph y sus ligandos denominados ephrin, desarrollan sus funciones estableciendo contactos físicos que median adhesión o repulsión entre distintos tipos celulares, afectando en muchos casos su supervivencia y proliferación (Pasquale, 2010). Los trabajos previos de nuestro grupo habían identificado la presencia de distintos miembros de la familia Eph/ephrin en células LLC aisladas de sangre periférica (Alonso-Colmenar y cols., 2009) que en cualquier caso podrían desempeñar un papel en las interacciones en el nicho de médula ósea. Más aún, el análisis comparativo de la expresión en SP y MO podría proporcionar nueva información sobre la clínica de la enfermedad. Un creciente número de artículos apoyan el papel de Eph/ephrin en el desarrollo normal de la hematopoyesis y osteogénesis, particularmente de la pareja constituida por EphB4 y ephrinB2 (Anam y cols., 2013, Wang y cols., 2014, Nguyen y cols., 2015) sustentando su posible papel en el establecimiento o mantenimiento de los de médula ósea en la leucemia. Más aún, son claras candidatas para mediar en la reconocida resistencia a la apoptosis mediada por adhesión (CAM-DR) proporcionadas por las BMSC. La interacción entre Eph/ephrin puede dar lugar a una señal bidireccional, denominada *forward* si sucede hacia la célula que expresa el receptor y *reverse* si se desencadena en la célula que porta el ligando. Por ello un papel autónomo o no autónomo de célula debe ser claramente diferenciado para poder interferir sobre el más relevante. Por otro lado, las moléculas Eph/ephrin pueden actuar tanto como supresores como promotores de procesos tumorales (Pasquale, 2010) destacando la relevancia de una caracterización precisa de su función.

El papel de los miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral en la LLC se ha incrementado en los últimos años. De forma destacada, los ligandos BAFF y APRIL así como sus receptores BAFF-R, TACI y BCMA tienen funciones importantes en la biología normal de los linfocitos B (Rickert y cols., 2011) y su desregulación conduce a procesos autoinmunes o

desórdenes linfoproliferativos (Cheema y cols., 2001, Batten y cols., 2004, Pontikoglou y cols., 2013). Distintos autores han resaltado su papel en la LLC, sosteniendo la viabilidad de las células leucémicas mediante mecanismos autocrinos y paracrinos (Kern y cols., 2004, Pontikoglou y cols., 2013).

Objetivos

- ✓ Analizar la expresión de la familia Eph/ephrin en células LLC obtenidas de muestras de sangre periférica y aspirados de médula ósea, para determinar su posible relación con la localización tisular, el estadio de enfermedad y la progresión clínica, así como su asociación con factores pronóstico como el estado mutacional de los genes IGVH o la expresión de ZAP70.
- ✓ Caracterizar los tipos celulares que componen el microambiente de médula ósea en la LLC, frente a los presentes en individuos sanos y su expresión de Eph/ephrin.
- ✓ Determinar cuáles de las interacciones Eph/ephrin están implicadas en la resistencia a la apoptosis espontánea o a la inducida por fármacos.
- ✓ Determinar si las interacciones Eph/ephrin sostienen la supervivencia de las LLC a través de la interacción con otras rutas conocidas de supervivencia como la estimulación a través del BCR/CD40 o la producción de BAFF/APRIL.

Resultados y discusión

El análisis cuantitativo de la abundancia de Eph/ephrin a nivel de ARNm, en las células LLC de SP y MO mostró que ephrinB2 era el miembro preferencialmente expresado por las células LLC-MO y más aún que era el único sobre-expresado en este compartimento celular frente al de sangre

periférica. Significativamente, la elevada expresión de ephrinB1 y ephrinB2 asociaba con muestras con los genes IGVH no mutados y/o positivas para ZAP 70. Ambos ligandos, al igual que los receptores EphB4 y EphB6 se encontraban elevados en estadios de Rai avanzados. Más aún, la expresión de ephrinB1 y ephrinB2, así como del receptor EphB4, se encontraba elevada en pacientes que presentaban un patrón de infiltración nodular o intersticial. Estos datos sugerían que los miembros de la familia Eph/ephrin podrían tener un papel diferencial en distintos momentos de la enfermedad, apuntando a la interacción entre ephrinB2 y EphB4 como responsable del establecimiento del microambiente favorable para las LLC.

El análisis por citometría de flujo confirmó los datos obtenidos mediante RT-qPCR y además mostró la existencia de una sub-población de células LLC-MO con elevados pero constantes niveles de ephrinB2 (ephrinB2^{high}). La proporción de estas células correlacionaba con el patrón de infiltración, disminuyendo significativamente en las médulas óseas con infiltración masiva o difusa. Más aún, el porcentaje de LLC-MO ephrinB2^{high} asociaba significativamente con marcadores de peor pronóstico, incluyendo genes IGVH no mutados y positividad para ZAP70. Esta sub-población mostró características inmunofenotípicas diferenciales respecto a la población mayoritaria en MO, por lo que distinguimos células ephrinB2^{high} y ephrinB2^{int} en MO y ephrinB2^{low} en SP. De manera interesante, las ephrinB2^{high} poseían una elevada expresión de moléculas que podían estar implicadas en CAM-DR, como las integrinas $\alpha 4$, αL y las correspondientes subunidades $\beta 2$ y $\beta 1$, CD44 y un descenso en la expresión de CXCR4 que podría ser compatible con un fenotipo de retención en la médula ósea. De forma sorprendente, esta sub-población carecía de la expresión del marcador de proliferación Ki67, por lo que descartamos que se tratase de células altamente proliferativas, sino que mas bien tendrían una capacidad incrementada de resistencia a apoptosis, debido a la elevada presencia de Bcl-2.

A tenor de estos resultados, las células LLC de MO y SP se cultivaron en presencia de distintas moléculas relacionadas con la supervivencia dentro

del microambiente medular. Las LLC de ambos compartimentos mostraron un incremento en su viabilidad en presencia de CXCL12, BAFF o APRIL, mientras que solo las muestras obtenidas de MO eran rescatadas por el cultivo sobre fibronectina o los ligandos de integrinas, seguido de distintas variaciones en el aumento de su expresión de ephrinB2 en comparación con el descenso de la misma tras el cultivo de estas células durante varios días en ausencia de estímulos externos. De manera interesante, encontramos que las células ephrinB2^{high} sólo aparecían en cultivos sobre VCAM-1 o BAFF y APRIL por lo que se trata de una población más dependiente de la adhesión a otros tipos celulares, que la mayoría de las células LLC-MO.

Agregados de células LLC-MO se observaron tras varios días de cultivo. El análisis de los mismos mediante microscopía confocal mostró la acumulación de ephrinB2 en los sitios de contacto entre las LLC-MO pero no en las LLC-SP. Más aún, el silenciamiento de la expresión de ephrinB2, condujo a un descenso crítico de la viabilidad en los cultivos de LLC-MO en ausencia de otros estímulos. Estos resultados sugerían un papel relevante de las interacciones homotípicas entre las células LLC en la supervivencia dentro del nicho, así como un papel de la señal *reverse* a través de ephrinB2. De forma añadida, observamos que ephrinB2-Fc inmovilizada en placa y EphB4-Fc, en menor medida, incrementaban los niveles intracelulares de BAFF y APRIL en las células LLC-MO. Mientras que sólo EphB4-Fc inducía cambios en la expresión de sus receptores, observándose un incremento en la expresión de TACI y un descenso en la de BAFF-R. Todas estas evidencias apoyaban el papel de ephrinB2 en el mantenimiento de la supervivencia de las células LLC en un mecanismo dependiente de la interacción de BAFF y APRIL con TACI. De forma concordante, la adición de las formas solubles de estos receptores, reducía la viabilidad de las células LLC-MO cultivadas sobre EphB4-Fc y en menor medida sobre ephrinB2-Fc. Más aún, EphB4-Fc inmovilizada en placa incrementaba la resistencia de las células leucémicas a los tratamientos con Fludarabina (F), Mafosfamida (M), Bendamustina (B) and Chlorambucil (C), aumentando la sensibilidad de las LLC por las unión de los ligandos BAFF/APRIL, apuntando al papel de ephrinB2 en la resistencia a fármacos.

La caracterización de las BMSC derivadas de los cultivos de células mononucleadas de MO de pacientes de LLC o de donantes sanos, mostró la existencia de células adherentes de gran tamaño con expresión de marcadores correspondientes a un fenotipo mesenquimal. Sin embargo, las BMSC-LLC sobre-expresaban moléculas como VCAM-1, BAFF, APRIL y CXCL12, probablemente debido a la presencia de células LLC durante la expansión del cultivo, capaces de modificar sus propiedades en su favor. De manera importante, las BMSC-LLC mostraron una elevada expresión de EphB4, con niveles similares a los encontrados en la línea células Hs27 y mayores que los de las BMSC-sanas y la línea Hs5.

Las líneas celulares de estroma humanos Hs5 y Hs27 se utilizaron para analizar los fenómenos de adhesión entre las células LLC y las BMSC. Nuestros resultados mostraron la adhesión preferente de las células ephrinB2^{high}. De manera interesante, en ensayos de conjugados, confirmamos que el porcentaje de agregados entre células LLC-MO y Hs27 estimuladas con TNF- α , se reducía drásticamente si las células LLC se pre-incubaban con EphB4-Fc, pero por el contrario se incrementaban si las BMSC se pre-estimulaban con ephrinB2-Fc. Esto sugería que la señal *forward* inducida por ephrinB2 en las células de estroma incrementaba la adhesión entre ambos tipos celulares. La comparación entre sistemas de co-cultivo directo o en cultivos en los que ambos tipos celulares se encontraban separados por un filtro, mostró la importancia de los contactos físicos en los mecanismos de supervivencia. Con el objeto de determinar la importancia de la interacción entre EphB4 y ephrinB2 en estos procesos, silenciemos la expresión de ambas moléculas en las BMSC y las células LLC respectivamente. De forma concordante, en ambos casos observamos un descenso de la viabilidad en los cultivos en contacto directo pero no en los separados por el filtro, apuntando a un papel clave de esta pareja de moléculas en los mecanismos de supervivencia mediados por las interacciones entre ambos tipos celulares.

La posibilidad de que estas interacciones tuviesen como consecuencia una mayor liberación de factores solubles pro-supervivencia, se comprobó en experimentos en los que las células LLC se cultivaron con medio condicionado derivado de los cultivos de células Hs27 estimuladas con ephrinB2 o co-cultivadas con células LLC ephrinB2^{high}. El medio resultante de las dos situaciones, incrementaba significativamente la viabilidad de las células LLC-MO. Más aún, la adición al medio de cultivo de los receptores BAFF-R y TACI en forma soluble o de anticuerpos contra los ligandos BAFF y APRIL, Inhibía los efectos pro-supervivencia de los medios condicionados, confirmando que las interacciones entre EphB4 y ephrinB2 promueven los efectos pro-supervivencia de BAFF/APRIL.

Conclusiones

En este trabajo hemos identificado una nueva sub-población de células LLC dentro del microambiente de médula ósea, expresando elevados niveles de ephrinB2 en la superficie celular, así como otras características inmunofenotípicas que la diferencian de la población mayoritaria residente en MO. Además nuestros resultados son compatibles con el papel de EphB4 en la LLC, dado su reconocida implicación en el desarrollo normal de la hematopoyesis.

Nuestros resultados muestran como la interacción entre ephrinB2 y EphB4 sostiene la supervivencia de las células LLC en los nichos de médula ósea, a través de las rutas de supervivencia de la familia del TNF, relacionada con la supervivencia y la resistencia a fármacos de las células LLC. Así mismo, estos resultados sugieren una posible organización espacial del microambiente de médula ósea en al menos 2 nichos funcionalmente distintos. En primer lugar un nicho dependiente de la interacción de las células LLC ephrinB2^{high} con BMSC. Este contacto induce la señal *forward* a través de EphB4 en el estroma que desencadena una mayor liberación de factores solubles, principalmente BAFF/APRIL en el microambiente que posiblemente facilitan el establecimiento del conjunto de las células leucémicas en estadios tempranos de la

enfermedad o tras las recidivas. Una vez que la infiltración masiva ha tenido lugar, las células leucémicas establecen su propio mecanismo autocrino de supervivencia a través de interacciones homotípicas en las que juega un papel determinante la señal reverse a través de ephrinB2, implicando también la señalización a través de BAFF y APRIL.

En definitiva, el tándem EphB4-ephrinB2 representa una nueva diana en los intentos para alterar el microambiente en la LLC.

Alonso-Colmenar, L. M., E. M. Trinidad, B. de Garcillan, M. Ballesteros, M. Castellanos, I. Cotillo, J. J. Munoz and A. G. Zapata (2009). "Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells." *Leuk Res* **33**(3): 395-406.

Anam, K. and T. A. Davis (2013). "Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations." *Stem Cell Res Ther* **4**(5): 112.

Batten, M., C. Fletcher, L. G. Ng, J. Groom, J. Wheway, Y. Laabi, X. Xin, P. Schneider, J. Tschopp, C. R. Mackay and F. Mackay (2004). "TNF deficiency fails to protect BAFF transgenic mice against autoimmunity and reveals a predisposition to B cell lymphoma." *J Immunol* **172**(2): 812-822.

Bracht, G., J. Pinon Hofbauer, R. Greil and T. N. Hartmann (2014). "The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia." *Ann Hematol* **93**(3): 361-374.

Burger, J. A. (2011). "Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**: 96-103.

Burger, J. A. (2012). "Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape." *Curr Opin Oncol* **24**(6): 643-649.

Cheema, G. S., V. Roschke, D. M. Hilbert and W. Stohl (2001). "Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases." *Arthritis Rheum* **44**(6): 1313-1319.

Collins, R. J., L. A. Verschuer, B. V. Harmon, R. L. Prentice, J. H. Pope and J. F. Kerr (1989). "Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro." *Br J Haematol* **71**(3): 343-350.

Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo and E. Montserrat (2003). "ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **348**(18): 1764-1775.

Hallek, M., B. D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M. J. Keating, E. Montserrat, K. R. Rai, T. J. Kipps and L. International Workshop on Chronic Lymphocytic (2008). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines." *Blood* **111**(12): 5446-5456.

Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier and F. K. Stevenson (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **94**(6): 1848-1854.

Kern, C., J. F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P. Y. Simonin, S. Feldblum and J. P. Kolb (2004). "Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway." *Blood* **103**(2): 679-688.

Kurtova, A. V., K. Balakrishnan, R. Chen, W. Ding, S. Schnabl, M. P. Quiroga, M. Sivina, W. G. Wierda, Z. Estrov, M. J. Keating, M. Shehata, U. Jager, V. Gandhi, N. E. Kay, W. Plunkett and J. A. Burger (2009). "Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance." *Blood* **114**(20): 4441-4450.

Lagneaux, L., A. Delforge, C. De Bruyn, M. Bernier and D. Bron (1999). "Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells." *Leuk Lymphoma* **35**(5-6): 445-453.

Molica, S., J. C. Reverter, A. Alberti and E. Montserrat (1990). "Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance." *Eur J Haematol* **44**(5): 277-281.

Moreno, C. and E. Montserrat (2008). "New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia." *Blood Rev* **22**(4): 211-219.

Nguyen, T. M., A. Arthur, R. Panagopoulos, S. Paton, J. D. Hayball, A. C. Zannettino, L. E. Purton, K. Matsuo and S. Gronthos (2015). "EphB4 Expressing Stromal Cells Exhibit an Enhanced Capacity for Hematopoietic Stem Cell Maintenance." *Stem Cells* **33**(9): 2838-2849.

Pasquale, E. B. (2010). "Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond." *Nat Rev Cancer* **10**(3): 165-180.

Plander, M., P. Ugocsai, S. Seegers, E. Orso, A. Reichle, G. Schmitz, F. Hofstadter and G. Brockhoff (2011). "Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma." *Ann Hematol* **90**(12): 1381-1390.

Pontikoglou, C., M. C. Kastrinaki, M. Klaus, C. Kalpadakis, P. Katonis, K. Alpantaki, G. A. Pangelis and H. A. Papadaki (2013). "Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Stem Cells Dev* **22**(9): 1329-1341.

Rai, K. R. and T. Han (1990). "Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia." *Hematol Oncol Clin North Am* **4**(2): 447-456.

Rickert, R. C., J. Jellusova and A. V. Miletic (2011). "Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease." *Immunol Rev* **244**(1): 115-133.

Rozman, C., E. Montserrat, J. M. Rodriguez-Fernandez, R. Ayats, T. Vallespi, R. Parody, A. Rios, D. Prados, M. Morey, F. Gomis and et al. (1984). "Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases." Blood **64**(3): 642-648.

Ruan, J., E. Hyjek, P. Kermani, P. J. Christos, A. T. Hooper, M. Coleman, B. Hempstead, J. P. Leonard, A. Chadburn and S. Rafii (2006). "Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma." Clin Cancer Res **12**(19): 5622-5631.

Wang, Y., A. Menendez, C. Fong, H. Z. ElAlieh, W. Chang and D. D. Bikle (2014). "Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation." J Bone Miner Res **29**(8): 1900-1913.

PUBLICACIONES

Research Paper

EphrinA4 plays a critical role in $\alpha 4$ and αL mediated survival of human CLL cells during extravasation

Miguel A. Flores^{1,3,*}, Paula Fortea^{1,3,*}, Eva M. Trinidad⁴, Dolores García², Gloria Soler², Francisco J. Ortuño², Agustín G. Zapata^{1,3}, Luis M. Alonso-Colmenar^{1,3}

¹Cytometry and Fluorescence Microscopy Research Center, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Hematology and Medical Oncology Department, HGU Morales Meseguer, Marqués de los Velez, 30008 Murcia, Spain

³Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Nováis, 2, 28040 Madrid, Spain

⁴Transformation and Metastasis Group, Cancer Epigenetic and Molecular Biology Program (PEBC), IDIBELL, 08908 Barcelona, Spain

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Luis M. Alonso-Colmenar, email: lmalonso@ucm.es

Keywords: leukemia, extravasation, apoptosis, integrin, ephrin

Received: March 04, 2016

Accepted: June 08, 2016

Published: June 27, 2016

ABSTRACT

A role of endothelial cells in the survival of CLL cells during extravasation is presently unknown. Herein we show that CLL cells but not normal B cells can receive apoptotic signals through physical contact with TNF- α activated endothelium impairing survival in transendothelial migration (TEM) assays. In addition, the CLL cells of patients having lymphadenopathy (LApos) show a survival advantage during TEM that can be linked to increased expression of $\alpha 4$ and αL integrin chains. Within this context, ephrinA4 expressed on the surface of CLL cells sequesters integrins and inactivates them resulting in reduced adhesion and inhibition of apoptotic/survival signals through them. In agreement, ephrinA4 silencing resulted in increased survival of CLL cells of LApos patients but not LA neg patients. Similarly was observed when a soluble ephrinA4 isoform was added to TEM assays strongly suggesting that accumulation of this isoform in the serum of LApos patients could contribute to CLL cells dissemination and survival in vivo. In supporting, CLL lymphadenopathies showed a preferential accumulation of apoptotic CLL cells around high endothelial venules lacking ephrinA4. Moreover, soluble ephrinA4 isolated from sera of patients increased the number and viability of CLL cells recovered from the lymph nodes of adoptively transferred mice. Finally, we present evidence suggesting that soluble ephrinA4 mediated survival during TEM could enhance a transcellular TEM route of the CLL cells. Together these findings point to an important role of ephrinA4 in the nodal dissemination of CLL cells governing extravasation and survival.

INTRODUCTION

Compelling evidence supports that CLL cell survival within the tumor microenvironment is highly dependent on extrinsic signals provided by non-leukemic cell types [1, 2]. Endothelial cells can protect CLL cells from spontaneous apoptosis in vitro through soluble factors and/or direct physical contacts [1–7]. Both findings suggest that endothelial cells could play a similar role during extravasation an issue that, to our knowledge, has not been

previously addressed. It has been emphasized a major effect of transendothelial migration (TEM) in the survival of non-leukemia cell types including granulocytes [8], T lymphocytes [9] or CD34+CD14+ monocyte precursors [10]. In agreement, the extravasation through inflamed vascular vessels or the specialized high endothelial venules (HEV) in lymphoid tissues [11] could affect the survival outcome of CLL cells.

In CLL cells, the TEM capacity is strongly dependent on $\alpha 4$ (CD49d) expression which together with

α L integrin (CD11a) contributes to enhance it in patients having lymphadenopathy [12–14]. CD49d can also mediate contact dependent survival of CLL cells within tumor microenvironment [6, 15] associating with inferior prognosis groups including unmutated (UM) IgHV or CD38 expressing cases. Together these lines of evidence strongly suggest that integrin dependent extravasation may be further linked to a survival advantage that needs, however, a definitive demonstration.

Moreover, CLL cells show a reduced TEM compared to that of normal B cells as demonstrated under static or flow in vitro TEM conditions [12, 14, 16] and in an adoptively transferred mice in vivo model [12]. We showed that this can be in part linked to overexpression of ephrinA4, a GPI-membrane-linked ligand of the Eph receptor family of tyrosine kinases which is found as a membrane bound and a soluble isoforms in CLL and normal B cells [17, 18]. Reverse signaling through the cell surface expressed isoform inhibits integrin mediated adhesions of CLL cells to endothelium through binding to EphA2 receptor on the surface of endothelial cells [16, 19] likely impairing extravasation. By contrast, the soluble isoform enhances TEM of CLL cells in vitro when bound by endothelial cells through EphA2. This process could be coupled to enhanced diapedesis through sequestration and internalization of ICAM-1 and VCAM-1 [16] rather than through increased vascular permeability of the altered endothelial junctions found after ephrinA1 treatment [20]. Moreover patients having lymphadenopathy show increased serum levels of ephrinA4 in addition to decreased expression of ephrinA4 on the surface of CLL cells [18]. Together these findings pointed to soluble isoform as a likely mechanism contributing to nodal dissemination of CLL cells which needed further confirmation in a more physiological in vivo setting [21–23]. Herein we present for the first time in vitro and in vivo evidence suggesting that the major role of two ephrin A4 isoforms in CLL could be related with a non-previously described mechanism of survival linked to extravasation strongly dependent on integrin signaling.

RESULTS

CLL cells, but not normal B cells, can suffer apoptosis through physical contact with TNF- α activated endothelium resulting in impaired survival after transendothelial migration (TEM)

The possible impact of extravasation in the survival of CLL cells was analyzed in the widely accepted [24] transendothelial migration (TEM) assays. HUVEC monolayers grown onto the filters were preactivated for 4 hour with TNF- α and then extensively washed in fresh culture medium before addition of the CLL cells onto them. The percentage of apoptotic (Annexin-V^{pos} 7AAD^{neg}) and viable cells (Annexin-V^{neg} 7AAD^{neg})

were measured by flow cytometry in the transmigrated (TM) and the non-transmigrated (non-TM) fractions after 4 or 12 hours. Values were compared to basal levels in control suspension cultures done in the bottom chambers of separate wells having or not a TNF α pretreated HUVEC monolayer onto the filter. A clear increase in the spontaneous apoptosis in control suspension cultures was only evidenced after 12 hours (Supplementary Figure S2) resulting in decreased viability irrespectively of the presence of a TNF-HUVEC monolayer on top of the filter (Figure 1A-i) discarding any effect of soluble factors from endothelium. The viability of CLL cells in the TEM assays was even more decreased in the two TEM fractions and, especially, in the TM cells compared to basal levels in the control suspension cultures in bottom chambers (Figure 1A-i) indicating that direct contact with endothelium was involved in these effects. Normal B cells suffered no significant changes in viability or an increased one in some samples (Figure 1A-ii) suggesting a proapoptotic effect of endothelium specifically in the CLL cells. Importantly, CLL cells transmigrating through non-activated HUVEC showed no significant changes in viability compared to basal levels (Supplementary Figure S3) highlighting that only activated endothelium mediated the apoptotic signals. The low cellular density in bottom chambers could explain the decreased viability of TM cells compared to the non-TM ones. However, no significant improvement in viability of TM cells was found when cell numbers in the bottom chambers were increased through direct addition of CLL cells at the initiation of the assays (Supplementary Figure S4). To further confirm that CLL cells could receive apoptotic signals while crossing the TNF-HUVEC monolayer we examined TUNEL stained filters through confocal microscopy. This demonstrated the occurrence of numerous apoptotic CLL cells in both sides of the filters with TNF-HUVEC compared to untreated HUVEC assays (Figure 1A-iii). Although absolute numbers of total and apoptotic CLL cells predominated in the upper side of filters (Figure 1A-iii, cartoons) the frequency of apoptotic cells was significantly higher in the underside (Figure 1A-iii) in agreement with a higher frequency of apoptotic cells in the bottom than the upper chambers, as determined by flow cytometry (Figure 1A-i). Together these data supported that CLL cells receive apoptotic signals during TEM.

Since previous studies had reported prosurvival effects of endothelium in CLL cells cocultured several days [1–7], we analyzed the endothelium role in CLL viability cocultured onto TNF- α or unstimulated HUVEC monolayers at 12 hours or at longer time points 2 or 5 days. In line with previous studies [1–7] we observed a prosurvival effect onto unstimulated and to a lower extent TNF-HUVEC but not earlier than 2 days (Figure 1B-i). Indeed, these prosurvival effects with TNF-HUVEC were preceded by a drop in CLL viability at 12 hours (Figure 1B-i) in concert with our TEM assays. In

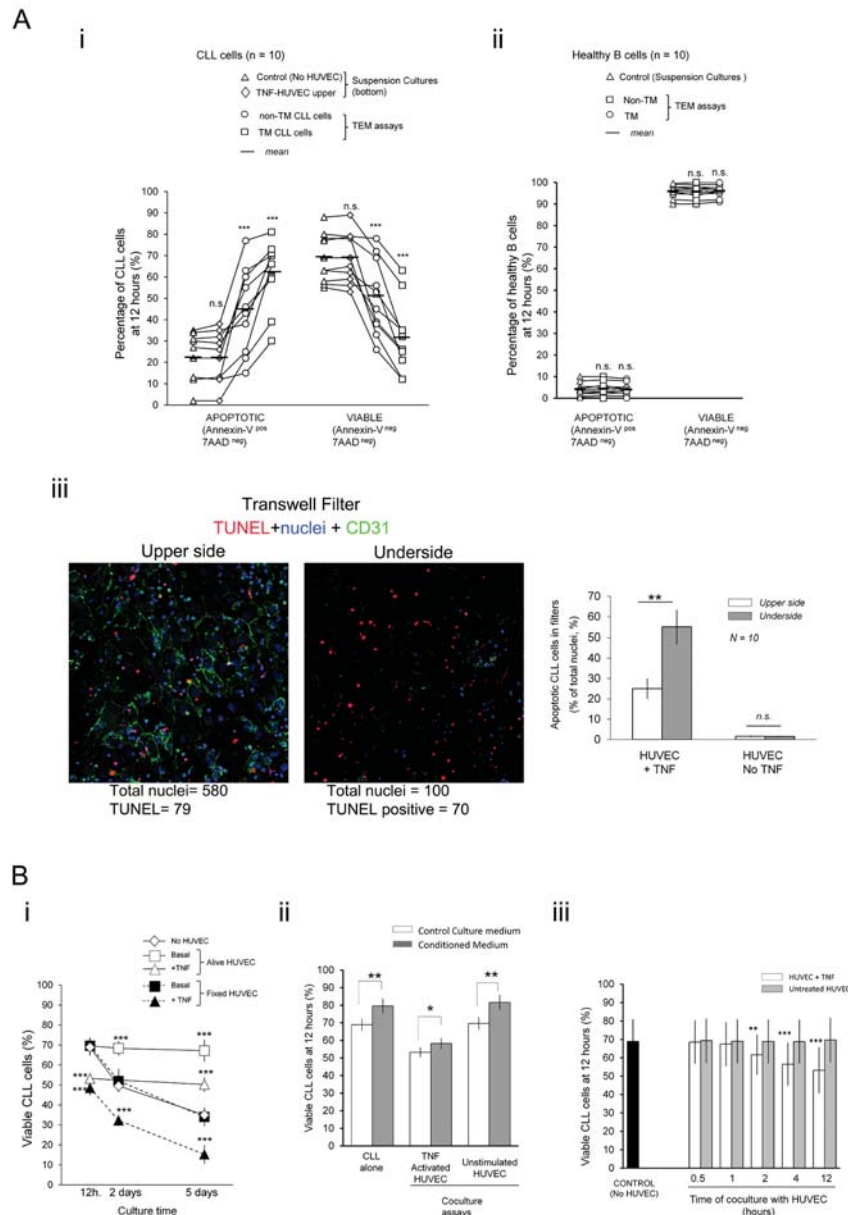


Figure 1: Physical contacts of CLL cells with TNF- α -activated endothelial cell monolayers during transendothelial migration (TEM) impair survival of leukemia cells. **A.** CLL cells from 10 patients (n. 1-10; Table 1) (i) or normal B cells isolated from the peripheral blood of 10 healthy donors (ii) were added onto TNF α pretreated confluent monolayer of HUVEC (TNF-HUVEC) in transwell plates (Transendothelial Migration (TEM) assays) or to the bottom compartment of separate transwells (Suspension cultures)(5×10^5 cells/well). Suspension cultures of CLL cells were carried out in bottom wells either with or without a TNF-HUVEC onto the upper filter. The percentage of apoptotic and viable cells in each experimental condition were determined after 12 hours by flow cytometry analysis of Annexin-V-PE/7AAD double staining. Each experimental condition was compared to basal levels in control suspension cultures without HUVEC (TEM assays: non-TM, non-transmigrated; TM, transmigrated). (iii) Transwell filters of TEM assays with CLL cells performed with TNF- α activated (+TNF) or untreated HUVEC (No TNF) were fixed and fluorescently stained with TUNEL (red; apoptotic nuclei), anti-CD31 (green; HUVEC junctions) and Hoechst (blue; total nuclei). Laser confocal microscopy images were taken from the upper and underside of filters (magnification 20x; ≥ 3 microscopy fields per filter; 1-2 filters per sample). Cartoons are from a representative TEM experiment with TNF-HUVEC. Total and TUNEL stained nuclei were counted (Image J; > 200 nuclei per sample and experimental condition) and the frequency of apoptotic cells in each side of the filters calculated (Right panel). Note that although the absolute number of nuclei was higher in the upper than the undersides the percentages of apoptotic CLL cells increased in the later one. Data are mean (\pm SD) from ten independent samples. **B.** i) CLL cells were cultured onto alive or paraformaldehyde fixed (fixed) TNF- α preactivated or untreated confluent HUVEC monolayers. The percentages of viable CLL cells (Annexin-V-neg 7AAD neg) were determined at the indicated time points by flow cytometry and compared to control suspension cultures without HUVEC. ii) CLL cells were cultured for 12 hours in suspension or onto alive HUVEC with normal culture medium or conditioned medium from 5 days CLL-HUVEC cocultures. iii) CLL cells were harvested at the indicated time-points from cocultures onto untreated or TNF-activated HUVEC and left in culture alone up to 12 hours. Two-tailed Student's t-test significance values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. non-significant.

addition, paraformaldehyde fixed instead of alive HUVEC monolayers lacked any prosurvival effects in the cocultured CLL cells and, more importantly, emphasized the proapoptotic ones onto TNF-HUVEC even at 2 or 5 days (Figure 1B-i) pointing to the release of prosurvival soluble factors in the alive conditions. Indeed, conditioned media from 5 days cocultures with alive HUVEC had prosurvival effects in the CLL cells cultured for 12 hours alone or under any coculture condition (Figure 1B-ii) definitively demonstrating that soluble prosurvival factors accumulate after prolonged coculture. We further concluded that 2 hours coculture of CLL cells with TNF-HUVEC was sufficient to receive proapoptotic signals that irreversibly led to their apoptosis when harvested and left in culture alone until 12 hours (Figure 1B-iii).

Together these data conclusively demonstrated that CLL cells suffer apoptotic signaling through direct contacts with TNF-HUVEC and likely during extravasation which needed further investigation.

CLL cells of patients having lymphadenopathy (LApos) have a survival advantage during TEM mediated by $\alpha 4$ and αL integrin chains

Having established that TEM impairs survival of CLL cells, we examined its possible association with disease related parameters including lymphadenopathy (LA), IGHV gene mutational status or ZAP-70 or CD38 antigens expression. To this end, the sample size was increased by including 20 additional patients in TEM assays (Table 1). In all cases examined we confirmed a decline in the viability of both TEM fractions relative to basal levels and mainly in the TM cells (from 68% mean basal values to 48% mean values in the TM cells) (Figure 2A-i). Nevertheless, because the viability levels in TEM assays varied between samples we normalized them to the basal ones as a measure of survival outcome. This allowed us to find a significant association with the lymphadenopathy (LA) condition of patients and to a lower extent ZAP-70 rather than IGVH mutational status or CD38 expression (Figure 2A-ii). Samples having lymphadenopathy (LApos) showed a better survival outcome than those lacking it (LANeg) (Figure 2A-ii) suggesting a possible association with the TEM capacity. In supporting this conclusion we found a strong correlation of survival outcome with the TEM rate of samples (Figure 2A-iii) that largely associated with LA condition rather than other parameters (Supplementary Figure S5A).

Because $\alpha 4$ integrin expression in LApos cases have been correlated with enhanced TEM capacity [12–14] and mediate survival signals from endothelium [6, 15], we investigated its possible association with TEM survival outcome. As determined by flow cytometry, the cell surface expression of $\alpha 4$ and αL integrins and their corresponding β chains were lower in CLL cells than in normal B cells although significantly increased in

LApos respect to LANeg cases (Figure 2B-i) in concert with enhanced TEM rate (Supplementary Figure S5B-C). Interestingly, there was a strong correlation of $\alpha 4$, rather than αL expression, with the survival outcome of TM cells (Figure 2B-ii) further supporting a specific role of $\alpha 4$ integrin in this outcome.

To further confirm this, we blocked $\alpha 4$ or αL interactions in separate TEM assays through preincubating the CLL cells of LApos and, for comparison, LANeg cases with recombinant forms of VCAM-1 (rhVCAM-1) or ICAM-1 (rhICAM-1) endothelial ligands, respectively. Five samples having different $\alpha 4$ or αL expressions within each LA clinical conditions were compared (Figure 2C). LApos cases showed a strong reduction in the TEM rate after blocking either of the two integrin interactions (Figure 2C-i) in contrast to LANeg samples (Figure 2C-i) confirming that both integrin chains play a critical role in TEM of LApos cases. Moreover, the viability of both, non-TM and TM cells, was strongly improved in the LApos cases under blocking either of the two integrins compared to the untreated samples while only αL blocking did in the LANeg cases (Figure 2C-ii). The bound recombinant ligands had no significant effects in the viability of CLL cells in control suspension cultures (Figure 2C-ii) indicating that their effects in TEM assays can be linked to the inhibition of the corresponding integrin interactions with endothelium. The survival outcome of TM cells was greatly improved in the LApos cases compared to that in control untreated assays (Figure 2C-iii). However, it was impaired relative to the non-TM cells compared to the control cultures (Figure 2C-iii) suggesting that integrin interactions rescued the CLL cells during diapedesis from proapoptotic signals received at initial adhesions.

In conclusion, these data showed that the integrin adhesions responsible of the enhanced TEM of CLL cells are also critically involved in the survival outcome.

Integrin dependent survival outcomes are counteracted by ephrinA4 reverse signaling

Having established that integrins enhance the survival outcome of TM CLL cells in LApos patients, we analyzed its possible modulation through ephrinA4 reverse signaling as previously reported by us [16]. As determined by flow cytometry, ephrinA4 expression was significantly higher in LANeg than LApos samples (Figure 3A-i) while no significant differences were found according to ZAP-70, IGVH or CD38 parameters (Figure 3 A-i) confirming its association with the LA condition of patients previously found by us [16, 18]. Remarkably, ephrinA4 expression levels were low in most trisomy 12 (tris12) cases (4 out of 5) and, to a lower extent, del11q positive samples (3 out of 4) (Figure 3A-i) which could be in concert with the increased risk to suffer lymphadenopathy in these patients. EphrinA4 expression and TEM survival followed an inverse correlation in both LA clinical groups (Figure 3A-ii) contrasting with

Table 1: Clinical and molecular details of patients

N.	G.	Age(y)	Rai	LA	IgHV ^a	ZAP-70 ^b	CD38 ^c	del13q	del17p	del11q	+12	ephrinA4 ^d	Integrin chain ^e			
													αL	β2	α4	β1
1	F	74	low	no	M	neg	neg	-	-	-	+	15.90	11.95	32.06	25.00	21.93
2	M	69	low	no	M	neg	pos	-	-	-	-	30.90	7.37	22.91	9.53	45.00
3	F	91	int	yes	UM	neg	pos	-	-	-	-	20.20	13.32	67.84	63.80	55.24
4	M	59	int	yes	M	neg	pos	-	-	-	-	7.70	13.20	57.45	24.28	50.74
5	M	78	hi	no	M	pos	neg	+	-	-	-	17.80	17.46	30.44	26.00	15.36
6	M	73	hi	yes	M	pos	pos	-	+	-	-	10.70	7.84	23.85	89.00	55.00
7	F	69	hi	yes	M	pos	neg	-	-	-	-	6.30	7.60	14.45	52.00	45.00
8	F	69	low	no	UM	neg	neg	+	-	-	-	36.47	9.92	13.69	19.60	7.58
9	F	78	int	yes	M	neg	neg	-	-	-	-	10.25	8.73	29.23	63.56	35.00
10	F	73	int	yes	M	neg	pos	+	-	-	-	7.83	42.12	65.56	56.78	59.23
11	F	65	hi	yes	UM	pos	neg	+	+	-	-	6.44	5.89	13.56	54.00	33.62
12	M	76	int	yes	UM	pos	neg	+	-	-	-	10.99	10.54	19.81	45.00	53.71
13	F	71	int	yes	M	pos	neg	-	-	-	+	12.62	35.48	56.68	16.53	69.67
14	F	58	hi	yes	M	neg	neg	-	-	-	-	10.46	10.85	21.07	78.00	63.00
15	M	69	int	yes	UM	pos	pos	+	-	-	-	9.63	51.00	54.00	56.00	25.00
16	F	63	int	yes	M	neg	neg.	+	-	-	+	11.25	20.00	23.00	98.00	65.00
17	M	79	int	no	UM	neg	neg	-	-	-	+	56.25	32.00	25.00	12.00	27.00
18	F	62	int	yes	M	neg	n.d.	-	-	-	-	6.98	8.00	68.00	34.00	32.00
19	F	85	int	yes	M	pos	neg	-	-	-	+	4.69	6.00	66.00	65.25	45.00
20	F	77	int	yes	UM	pos	neg	+	-	-	-	26.53	24.00	52.00	65.00	56.00
21	F	88	low	no	M	pos	neg	+	+	+	-	14.35	15.00	36.00	15.00	65.00
22	F	72	low	no	UM	pos	neg	+	-	+	-	62.25	7.00	35.00	15.00	53.00
23	M	75	low	no	UM	pos	neg	+	-	-	-	70.00	18.00	15.00	18.00	21.00
24	F	83	hi	yes	UM	neg	neg	-	-	-	-	18.69	33.00	84.00	70.00	45.00
25	F	58	low	no	M	pos	pos	-	+	-	-	68.00	26.00	29.00	33.00	56.00
26	F	66	low	no	UM	pos	neg	+	-	+	-	25.25	35.00	33.00	35.00	25.00
27	M	73	low	no	M	pos	neg	+	-	-	-	36.25	12.00	38.00	39.00	21.00
28	M	73	int	yes	M	pos	neg	-	-	-	-	14.56	54.00	61.00	66.00	68.00
29	M	68	low	no	UM	pos	pos	+	-	-	-	11.25	9.00	15.00	52.00	23.00
30	M	85	int	yes	UM	pos	pos	+	-	+	-	11.25	36.00	12.00	63.00	33.00

Footnotes: ^a Sequences with a germline homology of $\geq 98\%$ were considered as UM; ^{b, c} Determined by flow cytometry (Positivity cut off over isotype stained negative control stainings): ZAP-70, $> 25\%$ stained cells; CD38, $> 35\%$ stained cells; ^{d, e} Mean Fluorescence Intensity (MFI) determined by flow cytometry.

that observed for integrins (Figure 2B-ii). Accordingly, expression of ephrinA4 and CD49d followed an opposite pattern and, in the LAPos cases, the appearance of a CD49d high population correlated with a low ephrinA4 expression (Figure 3B). Together these data further supported a direct

and/or indirect role of ephrinA4 in the survival events during TEM modulating integrin adhesions.

To discriminate between these two possibilities we preincubated the CLL cells from the 30 patients with saturating amounts of recombinant extracellular domains

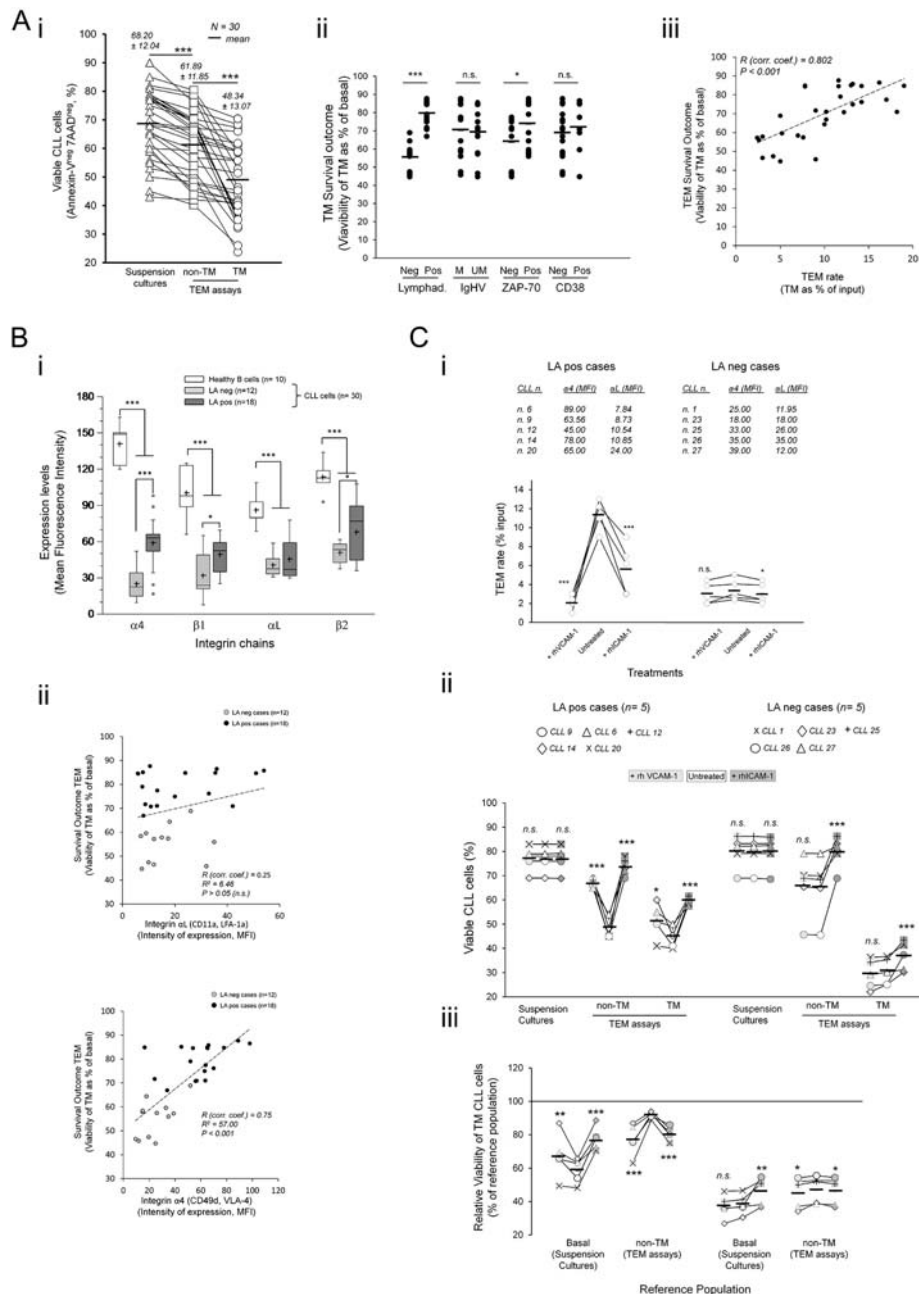


Figure 2: CLL cells of patients having lymphadenopathy (LAPos) show a survival advantage during TEM mediated by αL and $\alpha 4$ integrins. **A.** TEM assays through TNF-HUVEC were done with 30 patients and viability determined by flow cytometry analysis after 12 hours. i) Absolute values of viable cells. ii-iii) Viability of TM cells relative to basal levels in control suspension cultures without HUVEC (TM survival outcome) according to the indicated disease parameters (ii). iii) Linear correlation analysis between TM survival outcome and TEM rate. Absolute number of TM CLL cells, recovered from the bottom chambers, was measured by flow cytometry and expressed as percentage of total input cells (TEM rate). R , Spearman's correlation coefficient. **B.** Cell surface expression of the indicated integrin chains was measured in normal B cells and CLL cells by flow cytometry after staining with antigen specific antibodies. i) Whisper-box plots compare integrin expression levels (mean fluorescence intensity, MFI) between CLL cells and normal B cells, and between CLL cells of patients having or not lymphadenopathy (LAPos and LANeg, respectively). ii) Linear correlation analysis between survival outcome of TM cells and expression of αL (upper plot) or $\alpha 4$ (lower plot) integrins. R , Spearman's correlation coefficient. **C.** CLL cells from 10 patients, having (LAPos) or not (LANeg) lymphadenopathy, were preincubated or not (untreated) with recombinant soluble forms of human VCAM-1 (+rhVCAM-1) or ICAM-1 (+rhICAM-1) and left transminating through TNF-HUVEC monolayers (TEM assays) or cultured in suspension (suspension cultures) for 12 hours. Integrin expression levels (MFI) of the used samples are shown. i) TEM rate of samples were compared to that in control (untreated) TEM assays in LAPos and LANeg cases. ii) Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) after rhVCAM-1 or rhICAM-1 preincubation. Treatments are compared to control (untreated) assays. iii) Viability of TM cells as percentage of a reference population: basal levels (suspension cultures) or non-TM cells. Paired two-tailed Student's T test significance values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

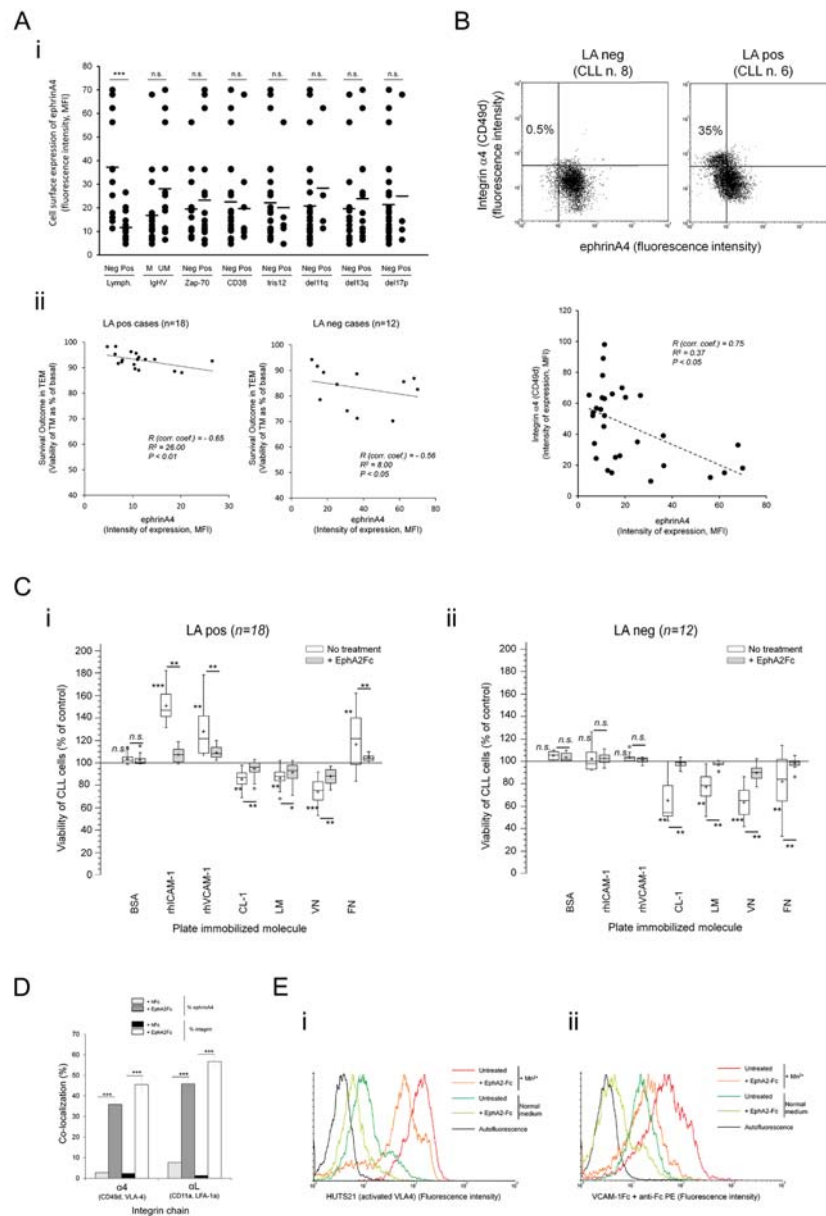


Figure 3: EphrinA4 reverse signaling suppresses integrin mediated survival signals through inhibiting activation state.

A. Expression of ephrinA4 was measured on the surface of CLL cells from 30 samples by flow cytometry analysis (MFI, mean fluorescence intensity) and (i) compared between samples according to disease parameters and cytogenetic characteristics or (ii) correlated with survival outcome of TM cells in LApos (left) and LANeg (right) cases. R: Spearman's correlation coefficient. **B.** Expression of ephrinA4 and CD49d ($\alpha 4$) on the surface of CLL cells was determined by flow cytometry (upper panels). Correlation analysis between ephrinA4 and $\alpha 4$ expression (mean fluorescence intensity, MFI) of samples. **C.** CLL cells from 30 patients (i, LApos; ii, LANeg) were preincubated (+EphA2Fc) or not (No treatment) with saturating amounts of soluble recombinant human EphA2 extracellular domains (EphA2Fc) and cultured for 12 hours in suspension in untreated plates (control) or plates containing the indicated molecules pre-immobilized to wells. BSA was used as a non-specific immobilized protein. Viability of CLL cells onto each protein is shown as percentage of basal levels in control suspension cultures without immobilized proteins. Statistical significances are shown for comparison between untreated cultures to control cultures or for EphA2Fc treatments to untreated conditions. Whisper-box plots: mean (+) and median (-) values. **D.** CLL cells from LApos samples (n=3) were preincubated in suspension with poly-His tagged EphA2Fc or hFc as control. Cell suspensions were then incubated with biotin anti-His followed by AlexaFluor488 streptavidin and adhered to slides for 15 min (37°C). After paraformaldehyde fixation (4% PF in PBS) slides were incubated with AlexaFluor647 conjugated monoclonal Ab for the indicated integrin chains and analyzed through confocal microscopy (Supplementary Figure S6). At least 3 fields per experiment were evaluated for colocalization analysis (Colocalization Tool, Image J). ≥ 200 cells per sample were analyzed. **E.** CLL cell suspensions (10^5 /assay) were incubated for 30 min with EphA2Fc or Fc only in RPMI/2% FCS (Normal medium) or containing 1mM MnCl₂ (Mn²⁺). Next, CLL cells were incubated with a PE coupled HUTS21 mAb in cold PBS (i) or PE coupled anti-Fc preclustered VCAM-1-Fc in normal medium (ii) followed by flow cytometry analysis. A representative LApos CLL sample is shown (n>3 samples). Paired two-tailed Student's T test significance values: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

of human EphA2 (EphA2Fc) which results in ephrinA4 reverse signaling modulating integrin affinity [16]. The viability of CLL cells was analyzed, as in the preceding TEM assays, at 12 hours of culture in suspension alone or onto plate immobilized rhICAM-1 or rhVCAM-1 or other integrin ligands of the extracellular matrix (ECM) including fibronectin (FN), collagen type-1 (CL-1), laminin (LM) or vitronectin (VN). EphA2Fc did not significantly affect the viability of CLL cells cultured onto immobilized BSA relative to control assays (Figure 3C-i-ii) discarding a direct role of ephrinA4 reverse signaling in CLL cell viability. However, it largely counteracted most of the effects onto integrin ligands (Figure 3C-i-ii), including the prosurvival ones observed in LApos cases onto either of the two endothelial ligands. ECM molecules mainly induced a decrease in the viability of CLL cells of all samples (Figure 3C-i, ii) excluding FN which had prosurvival effects in LApos cases (Figure 3C-i-ii) confirming the critical role of $\alpha 4$ in this clinical group. These data agreed with prosurvival signals mediated by αL and, mainly, $\alpha 4$ integrins in LApos cases during diapedesis, as concluded from blocking them in the preceding TEM assays, and further highlighted a role of ephrinA4 in regulating them. In line with our previous findings [16], EphA2Fc induced a significant increase in the number of non-adhered CLL cells recovered from the adhesion assays (not shown) which occurred in the absence of a significant decrease in integrin expression (not shown). Confocal fluorescence microscopy demonstrated a lack of intracellular staining for integrins but rather showed their sequestration on the surface of the EphA2Fc treated CLL cells (Supplementary Figure S6) (Figure 3D). These results suggested that physical interactions on the cell surface rather internalization could modulate the integrin binding capacities. Indeed, flow cytometry analysis of HUTS-21 Abs staining, which recognizes high affinity conformations of VLA4 integrins, demonstrated that EphA2Fc treatment strongly inactivated VLA4 in the CLL cells even when artificially activated through addition of Mn^{2+} to medium (Figure 3E-i). Accordingly, binding of soluble VCAM-1-Fc by CLL cells was dramatically reduced in the presence of EphA2Fc (Figure 3E-ii). In conclusion, these data supported that ephrinA4 signaling inhibits integrin affinities for their ligands and, hence, apoptotic/survival signals.

Absence of ephrinA4 reverse signaling dramatically improves the survival of TM CLL cells from LApos cases

To demonstrate a role of ephrinA4 reverse signaling in TEM assays, CLL cells were preincubated with saturating amounts of the EphA2Fc recombinant molecules. Under these conditions, bidirectional signaling between CLL and endothelial cells through the receptor-ligand pair is inhibited while ephrinA4 reverse signaling into the CLL cells still can take place [16]. In these experiments, six samples of each LA condition were chosen that differed in ephrinA4

expression levels within each group (Figure 4C; Table 1). In line with our previous findings [16], rhEphA2 did not significantly changed integrin expression of CLL cells (Figure 4A) but led to a marked drop in the TEM rate of all samples (Figure 4B) in concert with the inhibition of integrin adhesions. Indeed, as in the integrin blocking TEM assays, it significantly increased both the viability of non-TM and TM cells in all samples (Figure 4C-i) and, more importantly, the survival outcome of TM cells relative to basal levels in suspension cultures but not relative to the non-TM ones of LApos cases (Figure 4C-ii). Altogether, these data supported that ephrinA4 reverse signaling during diapedesis likely inhibits integrin prosurvival signals into the CLL cells of LApos cases.

Next, we blocked ephrinA4 signaling in TEM assays through siRNA mediated silencing of EphA2 in the endothelial cells. However, absence of this receptor in the endothelial cells rendered them unable to form a tightly packed monolayer (Figure 4D) thus limiting further TEM assays. Next, we challenged ephrinA4 silencing in the CLL cells from the 6 LApos and LANeg cases used in the preceding EphA2Fc TEM. Forty-eight hours after nucleofection, we found a strong reduction of ephrinA4 expression on the cell surface (Figure 5A) without significantly compromising their viability as compared to untreated or control nucleofected samples. EphrinA4 knock-down had not significant effects on the expression of integrins but markedly reduced the TEM rate of samples as compared to siRNA neg or untreated CLL cells (Figure 5B-i) and the number of CLL cells retained onto the HUVEC monolayer increased as determined by fluorescent microscopy analysis of transwell filters (Figure 5Bii-iii). Collectively, these findings confirmed that ephrinA4 decreases adhesion [16, 18]. In terms of viability, ephrinA4 knock-down led to a marked decrease in the viability of non-TM cells of both LA clinical groups compared to siRNA neg nucleofected or untreated cells (Figure 5C-i) which was compatible with the increased adhesion and, hence, occurrence of proapoptotic signals at initial steps of TEM. By contrast, the viability of TM cells was dramatically improved in the LApos but not the LANeg cases compared to that in untreated samples and, more importantly, to their corresponding non-TM cells (Figure 5C-i) a finding also confirmed in terms of survival outcome (Figure 5C-ii). Together with the preceding integrin blocking or EphA2Fc TEM assays, these results supported that switching-off ephrinA4 reverse signaling during diapedesis represented a survival advantage for the CLL cells of LApos cases.

Soluble ephrinA4 binding to endothelium strongly potentiates survival advantage of CLL LApos cases

As previously demonstrated by us [18], herein we confirmed higher levels of soluble ephrinA4 in the

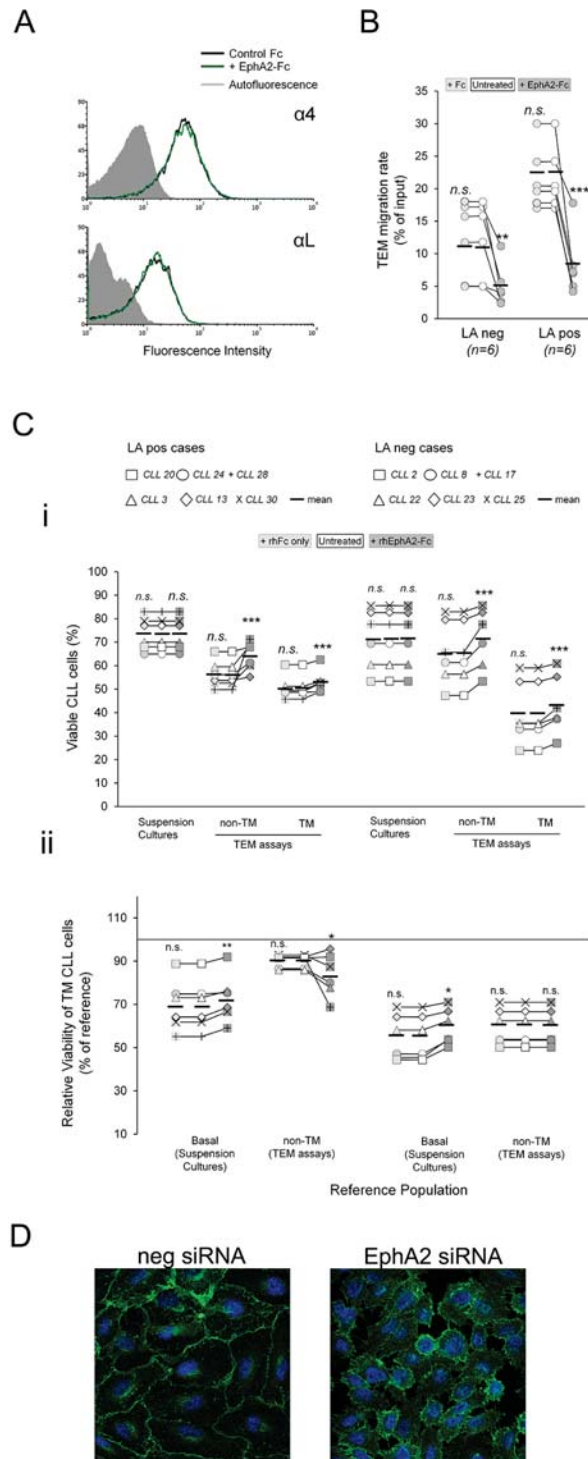


Figure 4: EphrinA4 reverse signaling inhibits survival signaling during diapedesis. CLL cells from the indicated patients having (Lapos) or not (LANeg) lymphadenopathy were preincubated with EphA2Fc or hFc or left untreated and allowed transmigration through TNF-HUVEC monolayers (TEM assays) or cultured in suspension (suspension cultures) for 12 hours. **A.** Representative flow cytometry histograms of $\alpha 4$ or αL integrin expression in CLL cells before and after incubation with EphA2Fc. **B.** TEM rate of samples, as determined by flow cytometry, were compared between hFc or EphA2Fc treatments to untreated cultures in Lapos and LANeg cases. **C.** Effects of EphA2Fc in viability of CLL cells. i) Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) after rhEphA2Fc or hFc treatment compared to control, untreated CLL cells. ii) Relative viability of TM cells as percentage of basal levels in suspension cultures or of the corresponding non-TM cells. **D.** HUVEC were nucleofected with EphA2 specific or negative control siRNA. VE-Cadherin (green) stained HUVEC cultures demonstrated that EphA2 silencing inhibited the formation of a proper confluent monolayer. Paired two-tailed Student's T test significance values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

serum from patients having lymphadenopathy than in those lacking it (Figure 6A) whereas a clear association with other parameters was not found (Figure 6A). Mechanistically, soluble ephrinA4 enhances extravasation of CLL cells after binding to EphA2 receptor on the surface of endothelial cells [16] through inhibiting cell surface expressed ephrinA4 mediated reverse signaling, thus allowing integrin mediated adhesions. Furthermore, EphA2 mediated sequestration and internalization of VCAM-1 and ICAM-1 endothelial ligands could be

involved in this process [18]. To analyze whether this mechanism could contribute to improve the survival of CLL cells in TEM assays, we preincubated the TNF-HUVEC monolayer with saturating amounts of soluble recombinant human ephrinA4 (ephrinA4Fc) as previously described [18]. This resulted in an increased TEM rate of Lapos but not the LANeg cases (Figure 6B-i) confirming our previous findings [16]. Moreover, the viability of non-TM and TM cells of Lapos samples was dramatically improved (Figure 6B-ii) along with an enhancement in

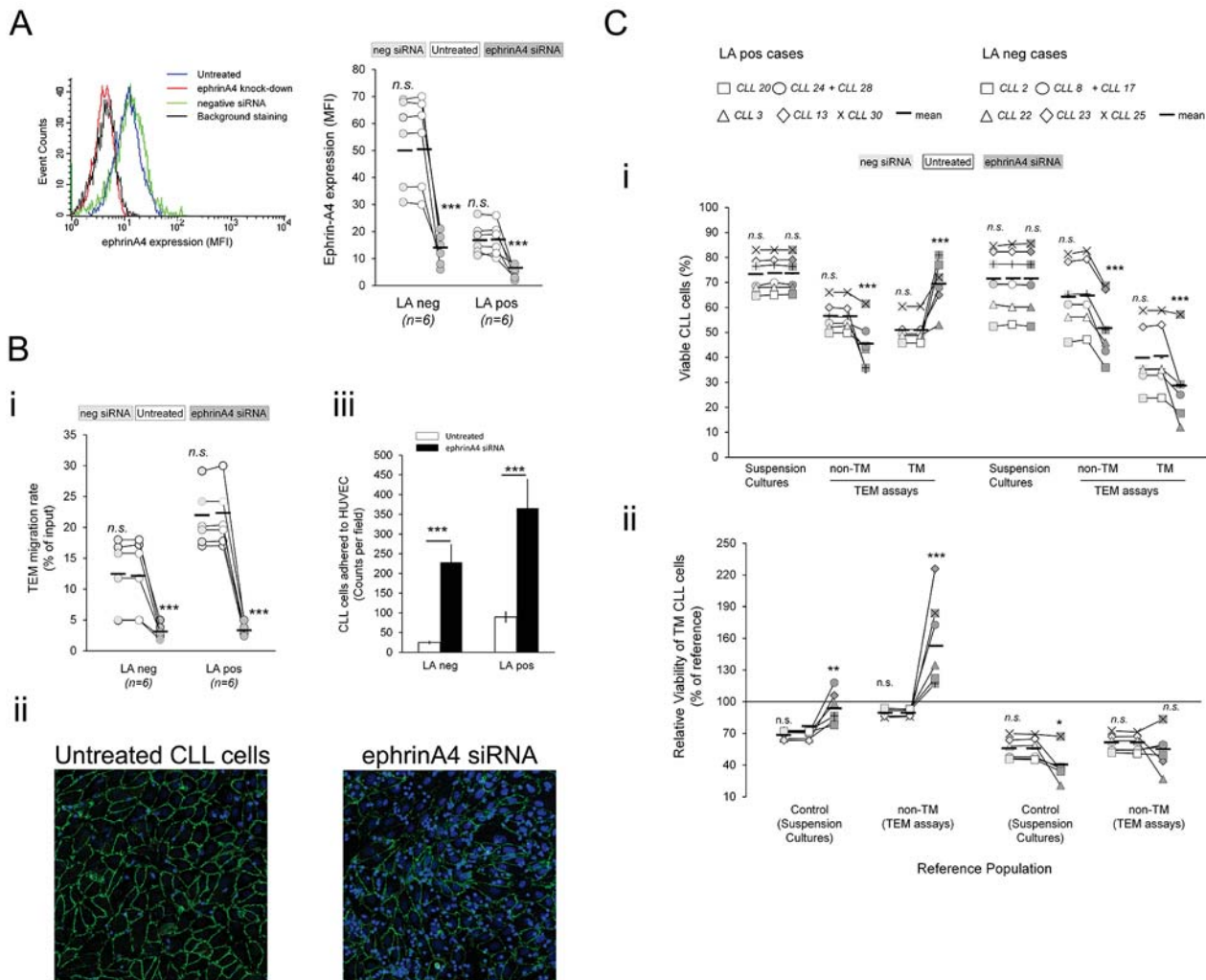


Figure 5: Absence of ephrinA4 reverse signaling during TEM increases survival outcome of TM cells in Lapos samples. CLL cells of the 12 patients used in EphA2Fc assays having (Lapos) or not (LANeg) lymphadenopathy (Figure 4), were nucleofected with ephrinA4 specific or negative control siRNA duplexes or left untreated. **A.** EphrinA4 silencing was determined by flow cytometry 48 hours after nucleofection. **B.** Untreated or nucleofected cells (siRNA neg or ephrinA4) were left transmigrating for 12 hours through TNF-HUVEC. **i)** TEM rate of samples measured by flow cytometry. **ii)** Transwell filters from TEM assays were stained with anti CD31 mAb (green, HUVEC junctions) and Hoechst (blue, nuclei) and examined by confocal microscopy (40x oil immersion; Leica TCS-SP2). CD31 junctions were not altered in the HUVEC monolayer of ephrinA4 knock-down samples. **iii)** Absolute counts of CLL cells adhered to TNF-HUVEC were measured by image analysis (ImageJ; > 200 nuclei counted per filter). **C.** Analysis of CLL cells viability in TEM assays after ephrinA4 knock-down. **i)** Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) were compared between ephrinA4-specific or neg control siRNA nucleofected to control untreated CLL cells. **ii)** Relative viability of TM cells as percentage of basal levels in suspension cultures or of non-TM cells. Paired two-tailed Student's T test significance values: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

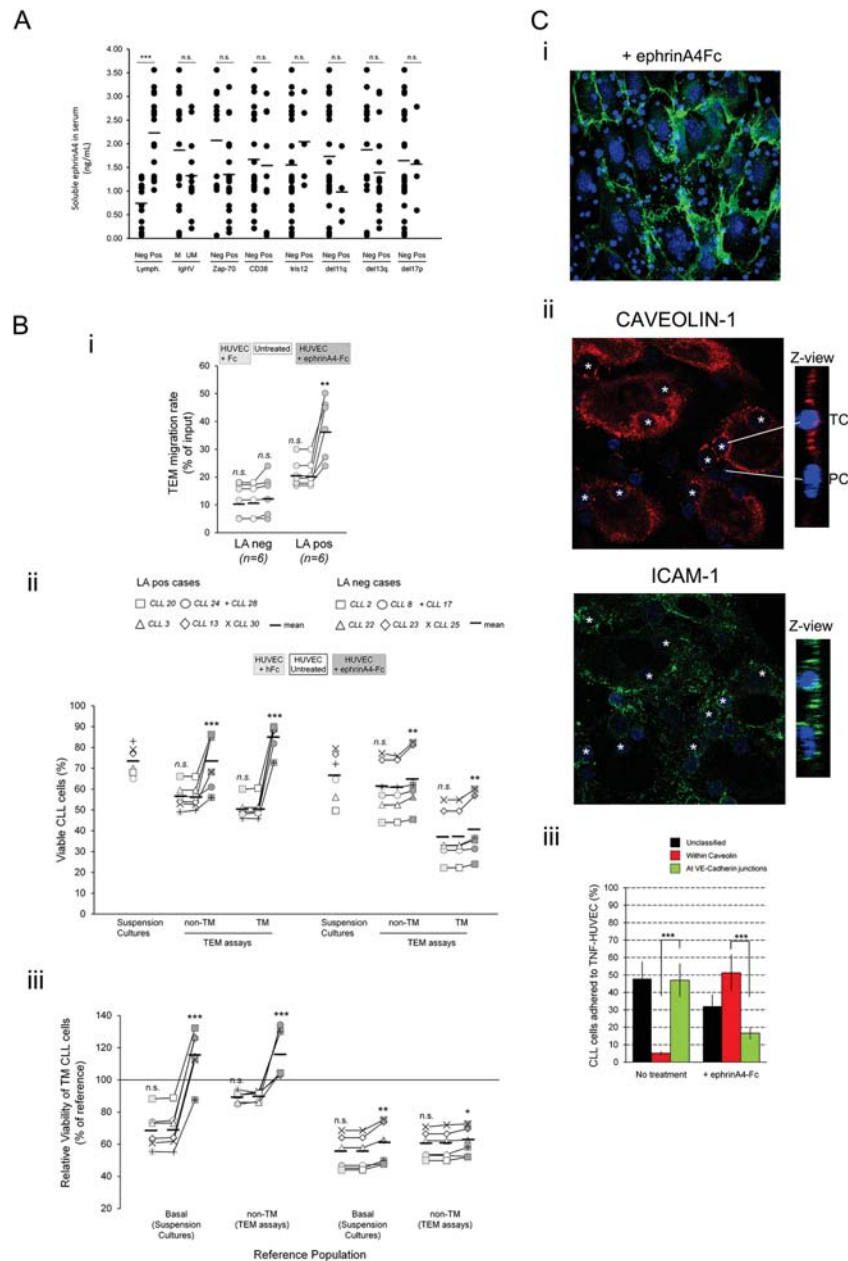


Figure 6: Treatment of TNF-HUVEC with soluble recombinant human ephrinA4 strongly potentiates survival of CLL cells and a possible transcellular TEM pathway. **A.** Soluble ephrinA4 levels in the serum of CLL patients were determined by indirect ELISA (ng/mL) and possible associations with clinical parameters examined. **B.** CLL cells from 12 patients having (LApos) or not (LANeg) lymphadenopathy, used in the EphA2Fc or siRNA assays (Figures 3 and 4), were left transmigrating 12 hours through TNF- α preactivated HUVEC monolayers preincubated (30 min) with saturating amounts of recombinant human ephrinA4 (HUVEC+ephrinA4Fc), purified human Fc (HUVEC + hFc) or untreated before addition of CLL cells. **i)** Absolute number of transmigrated cells (TM) was counted by flow cytometry and expressed as percentage of total input cells (TEM rate). **ii)** Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) in the ephrinA4Fc or hFc treated TEM assays were compared to untreated conditions. **iii)** Relative viability of TM cells normalized to basal levels (suspension cultures) or to the corresponding non-TM cells in the ephrinA4Fc or hFc treatments compared to untreated TEM assays. **C.** **i)** Transwell filters were stained with anti VE-Cadherin (green, HUVEC junctions) and Hoechst (blue, nuclei) and examined by confocal microscopy. Adhered CLL cells were located at VE-Cadherin interendothelial junctions or separated from them. **ii-iii)** Caveolin-1 and ICAM-1 immunofluorescence staining of TEM assays done in chamber slides 2 hours after coculture with LApos CLL cells. **ii)** CLL cells inside of HUVEC were surrounded by caveolin-1 endothelial caveola (asterisks, > 1 μ m from VE-Cadherin junction) and ICAM-1. Insets show Z- views of caveolin and ICAM-1 staining for a transcellular (TC) and a paracellular (PC) TEM CLL nuclei. **iii)** Measurement of CLL cells located within caveolin-1, at VE-Cadherin junctions or unclassified in ephrinA4Fc treated compared to untreated TNF-HUVEC after 2 hours coculture (at least 200 nuclei were counted per condition). Paired two-tailed Student's T test significance values: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

the survival outcome of TM cells compared to untreated control TEM assays (Figure 6B-iii), confirming a prosurvival role of soluble ephrinA4 during TEM of LApos CLL cells.

Next, immunofluorescence microscopy analysis of the transwell filters showed that VE-Cadherin⁺ junctions between HUVECs were unaltered in the ephrinA4Fc treatments (Figure 6C-i) discarding that CLL cells traversed through holes as a possible explanation to the increased survival. Moreover, CLL cells located at VE-Cadherin junctions (Figure 6C-i), suggesting a paracellular (PC) TEM route, or at > 1µm from them possibly following a transcellular (TC) TEM routes, as previously demonstrated [25]. To confirm a TC TEM pathway, we examined by confocal microscopy a possible association between intracellular caveolin-1 staining, which has been related with this TEM route in lymphocytes [26, 27], and the CLL cells actually inside of endothelial cells located > 1µm of interendothelial junctions. Many CLL cells inside of HUVEC were distinctly located within caveolin-1⁺ endothelial vacuoles and surrounded by ICAM-1 staining (Figure 6C-ii) suggesting a TC route of TEM. Image based counting of CLL cells at VE-Cadherin junctions or > 1µm within caveolin-1 in TEM assays revealed an increased frequency of the later under ephrinA4Fc treatments (Figure 6C-iii) in concert with an enhanced TC pathway through the endothelial cell body. These data confirmed that soluble ephrinA4Fc does not induce a TEM of CLL cells through disassembling interendothelial junctions but rather through endothelial cells themselves likely through a TC route of TEM.

EphrinA4 can be detected in the HEV of CLL lymphadenopathies and enhances viability of CLL cells infiltrating the lymph node of adoptively transferred mice

A possible correlation between apoptosis and in vivo extravasation was indirectly investigated by immunofluorescence microscopy analysis of CLL lymphadenopathies. Apoptotic cells were detected in tissue sections through TUNEL staining and their location relative to HEV through PNA^d staining. At low magnification, we confirmed an accumulation of apoptotic cells within 200 µm areas under the capsule in the three LA studied (Figure 7A-i). Because normal lymph node architecture is profoundly effaced in CLL lymphadenopathies we referred to these areas concentrating apoptotic cells near the capsule as outer rather than cortical regions, and as inner regions to the deeper ones inside of the LA parenchyma. Interestingly, apoptotic cells were closer to HEV in outer than inner regions (Figure 7A-i) indirectly suggesting an association with extravasation. After extravasation normal lymphocytes are retained for hours within an area of < 20 µm around the HEV of cortical lymph node regions

before infiltrating the LN parenchyma [28], a feature that correlated with an accumulation of apoptotic cells around them. Indeed, we found that the number of apoptotic nuclei within ≤ 20 µm around the HEV was markedly higher in the outer than the inner LA areas (Figure 7A-ii) suggesting that they could represent recently extravasated CLL cells. Its possible association with ephrinA4 staining was further examined. EphrinA4 staining was found not only in the infiltrated CLL cells but also within the endothelial cells of HEV bound to EphA2 (Figure 7B-i). Quantification of ephrinA4 staining bound to EphA2 in HEV in outer and inner regions (Figure 7B-ii) revealed a significant higher frequency in the former (Figure 7B-iii) thus following a completely opposed distribution to that observed for apoptotic cells. Altogether these data supported a possible in vivo prosurvival role of soluble ephrinA4 related to the extravasation of CLL cells into lymphadenopathies.

To assess this in a more physiological condition, CFSE stained human CLL cells of LApos and LANeg patients were adoptively transferred to Balb/c mice receiving different amounts of a soluble ephrinA4 purified from the sera of CLL patients. The percentage and viability of CLL cells was analyzed 24 hours later by flow cytometry (Supplementary Figure S1) in cell suspensions of the popliteal lymph node where the number of endogenous mouse lymphocytes is greatly lower than in other lymph nodes. EphrinA4 led to an increase in the proportion (Figure 7C, Bars) and viability (Figure 7C, lines) of the human CLL cells recovered from the lymph nodes of mice inoculated with LApos samples in a concentration-dependent manner.

DISCUSSION

Herein we provide evidence, for the first time, that CLL cells establish physical contacts with endothelia that can result in decreased survival during extravasation. In patients having lymphadenopathy, CLL cells are able of collecting prosurvival signals through αLβ2 and α4β1 integrins linked to ICAM-1 and VCAM-1 mediated diapedesis. In these processes, the soluble form of ephrinA4, that accumulates in the sera of patients having lymphadenopathy [18], plays an instrumental role. In these patients, ephrinA4 binding to EphA2 receptor on the luminal side of endothelial cells facilitates the adherence and migration of CLL cells through the endothelial vessels of lymphoid tissues, coupling enhanced TEM to prosurvival signals. Thus, the present findings expand our previous studies on the role of ephrinA4 isoforms in CLL cell adhesion and TEM [16, 18] by further connecting them to CLL cell survival and lymphadenopathy.

Our present results shed new light on the role of endothelial cells in CLL. In accordance with previous studies [3, 4, 6, 29–31] we demonstrate that endothelial cells can provide prosurvival signals to

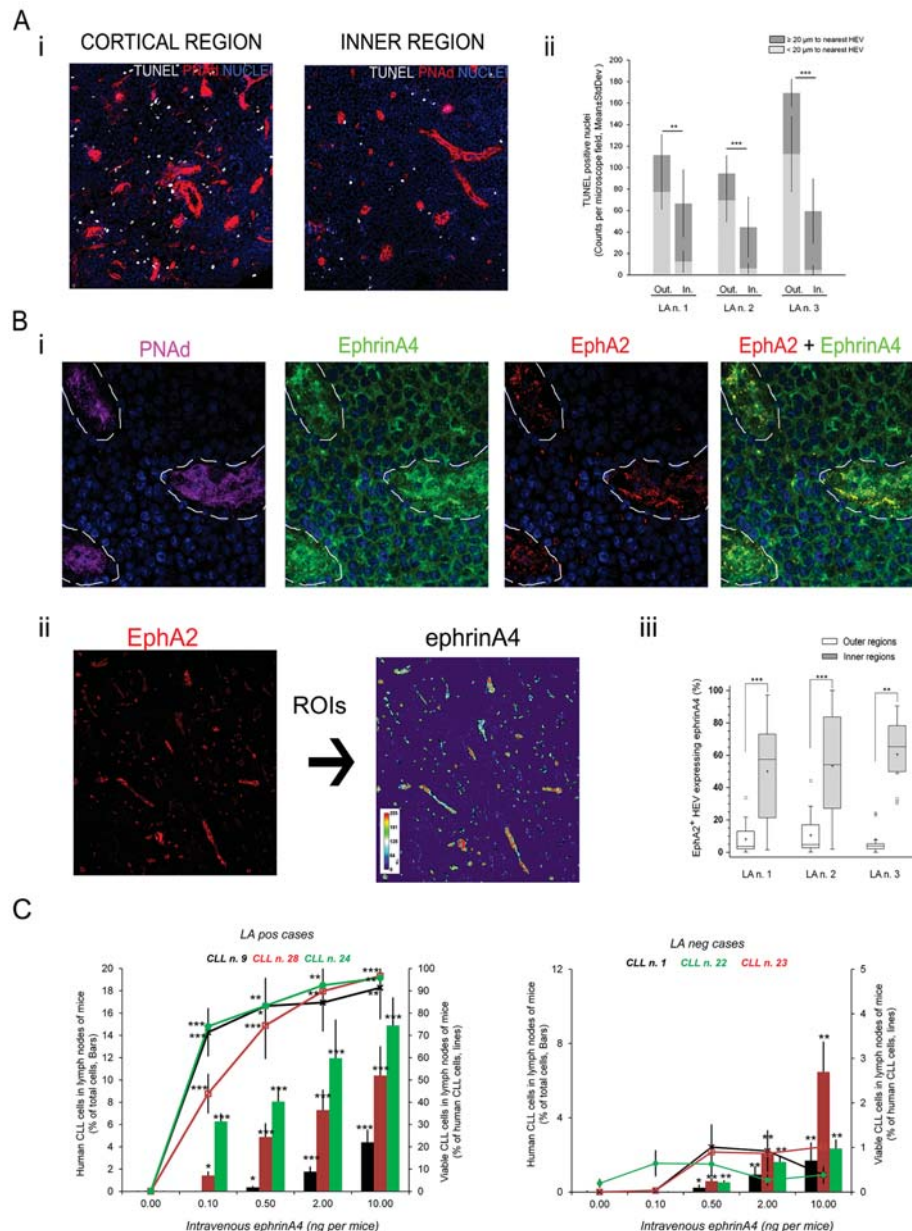


Figure 7: Soluble human ephrinA4 in HEV of lymphadenopathies inversely correlates with apoptotic cells near HEV dramatically enhancing the number and viability of human CLL cells recovered from lymph node of adoptively transferred mice. A-B. Seven μ m thick sections from frozen CLL lymphadenopathies (LA n. 1, 2 and 3 corresponding to CLL patients n. 3, 18 and 28, respectively) were fixed in acetone and sequentially incubated with A) TUNEL (white) and antibodies against PNA α (red) or B) antibodies against PNA α (magenta), ephrinA4 (green), EphA2 (red). In all cases nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Fluorescent images were taken in a laser confocal microscope (TCS SP-2 AOBS, Leica). A) Representative low magnification images (20 \times) of areas near the capsule ("Cortical" region, left panel) or deeper (>200 μ m far from capsule, "Inner" regions; right panel). ii) Frequency of apoptotic nuclei around ($\leq 20 \mu$ m) or separated from HEV in cortical and inner LA regions (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). B) i) HEV (PNA α $^{+}$, magenta; dotted line) showed strong ephrinA4 staining co-localizing with EphA2. (63 \times). ii) Regions of interest (ROI) were traced around HEV according to EphA2 staining (left). Intensity of ephrinA4 staining within ROIs was measured (pseudocolor scale inset). iii) HEVs containing $\geq 10\%$ pixels above 200 gray-scales were considered as positive. Whisper-box plots of > 20 measured fields from each LA section. Unpaired two-tailed Student's t-test significance values were * $p < 0.01$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. C. Human CLL cells were stained with CFSE fluorescent tracer and adoptively transferred into germ-free young Balb/c mice (2×10^7 per mice) by intravenous injection through the tail vein along with increasing concentrations of human soluble ephrinA4 purified from the sera of patients. Mice were sacrificed 24 hours later and cell suspensions from popliteal lymph nodes stained with an anti-mouse CD45 antibody, AnnexinV-PE and 7AAD for flow cytometry analysis. Human CLL cells were gated according to CFSE positivity and negativity for anti-mouse CD45 (Suppl. Figure S1). Data (mean \pm SD) were compared to mice receiving human CLL cells in PBS without ephrinA4. Five animals were used per sample and experimental condition. Paired two-tailed Student's T test significance values were * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

the leukemia cells within infiltrated tissues which are largely mediated by the release of prosurvival soluble factors. This is dependent on physical contacts between both cell types likely favored by prolonged coexistence within the infiltrated tissues. In supporting this hypothesis we demonstrated a lack of prosurvival effects in prolonged cocultures when using PF fixed rather than alive HUVEC. Besides, conditioned medium from long term cocultures protected the CLL cells from spontaneous and TNF-HUVEC mediated apoptosis in overnight (12 hours) cultures. By contrast, the timeframe of extravasation process is not presumably long enough [27] to promote the release of soluble factors by endothelial cells while proapoptotic signals through physical contacts could predominate. This is supported by the increase of apoptotic CLL cells in the non-TM cells and can likely take place as early as 2 hours after contact as further demonstrated in cocultures. It would be interesting to confirm our results under flow conditions in a model recently used by other authors [13, 32] or through adapting flow conditions to transwells [33]. During diapedesis the CLL cells can be rescued from propapoptotic signals received at initiation of TEM in LApos cases. However, we cannot exclude that the migrated CLL cells could receive other survival signals once inside the lymph node parenchyma although our studies in LN sections show numerous apoptotic cells near to HEV. These data suggest that many recently migrated cells die without infiltrating the tissue and especially when migrating through the HEV lacking ephrinA4 that predominate in outer LA regions.

Our results also confirm a critical role of integrins in the pathobiology of CLL [13, 34–36] further emphasizing that they represent a link between extravasation and survival of leukemia cells. Increased levels of CD49d ($\alpha 4$) expression can be associated with inferior prognosis in IgHV-UM and CD38 expressing cases [37] and the occurrence of trisomy 12 likely associating with the appearance of lymphadenopathies [12–14, 22]. Its expression in CLL cells of LApos patients has been related with enhanced $\alpha L\beta 2$ adhesion to ICAM-1 during transendothelial migration [34]. Indeed, CLL cells from patients lacking lymphadenopathy show a defective $\alpha L\beta 2$ dependent motility and TEM which is in part corrected through expression of $\alpha 4\beta 1$ in those suffering this organomegaly [34, 38]. This likely explains the lack of LANeg samples to receive prosurvival signal in TEM or when cultured onto ICAM-1 or VCAM-1 and further emphasizes the survival advantage of LApos cells. In agreement with previous studies highlighting a critical role of $\alpha 4$ in the endothelial mediated survival of CLL cells [6, 15, 38, 39] we further demonstrate that this is especially relevant in lymphadenopathy cases. By contrast, the finding of proapoptotic signaling mediated by these

and/or other integrins in the CLL cells when cultured onto ECM ligands or that highlighted in TEM assays were completely unexpected. Integrins dual effects on cell survival, interchanging apoptosis or survival outcomes, have been found in other cell types including hematopoietic tumor cells [40–43]. This can be related with potentiated and sustained adhesion [40] or through unligated integrins [41] or their activation state prior to ligation recruiting caspases [41] and/or ERK rather than Akt kinase [42]. Together these mechanisms and/or other unknown ones may contribute to the presently observed apoptotic outcome when adhering to inflamed endothelium through ligands different from ICAM-1 or VCAM-1.

In keeping with such an integrin dependent survival of CLL cells, cell surface expressed ephrinA4 arises as a critical mediator counteracting apoptosis at initial adhesion steps and nonetheless the prosurvival ones in LApos CLL cells during diapedesis. Repulsive signals mediated by the surface expressed isoform, as previously shown by us [16], along with blood flow could likely contribute to detach the CLL cells from vascular vessels preventing adhesion related apoptotic signals. In LApos patients, by contrast, down regulation of membrane expressed ephrinA4 is needed to allow the firm adhesion to endothelium through $\alpha 4$ and αL integrins [16, 18]. Moreover, we show that ephrinA4 is able of inhibiting high affinity conformational states of integrins through cell surface dependent physical sequestration rather than cell internalization. In supporting this mechanism, we also show enhanced adhesion to endothelium of ephrinA4 silenced CLL cells. The knock-down assays further demonstrate that absence of reverse signaling, but not of ephrinA4 itself, is necessary for LApos samples to go on with diapedesis but not for recruiting survival signals via integrins. The inverse association between ephrinA4 and CD49d molecules further highlights the possible existence of common mechanisms regulating their expression on the CLL cells to assure extravasation. Remarkably, in spite of the low number of tris12 and del11q cases included in the present study, most of them showed low ephrinA4 levels on the surface of CLL cells, a finding that could be linked to the increased tendency to develop lymphadenopathies in these patients.

Accordingly, it is on this basis that binding of the soluble ephrinA4 to endothelial EphA2 arises as a critical mechanism to promote TEM [21–23] coupled to survival in LApos cases. The finding of apoptotic CLL cells near HEV lacking ephrinA4 within the lymphadenopathies indirectly supported also the possible occurrence of this process in vivo. This was further confirmed in chimeric mice assays that, although not physiological at all, represent a good experimental protocol to study in vivo lymph node or bone marrow seeding capacity of human CLL cells [12, 44]. Besides we show that soluble ephrinA4

could promote a transcellular TEM route of CLL cells, as concluded from the VE-cadherin and caveolin-1 stainings of TEM assays, rather than through inducing holes in the HUVEC monolayer as observed in other endothelial studies of permeability using ephrinA1 rather than ephrinA4 [20]. Caveolin-1 mediated TC TEM is coupled to ICAM-1 and VCAM-1 transcytosis [26] similarly to what we have observed in the case of ephrinA4 mediated internalization of EphA2 [16]. Moreover, EphA2 can physically interact with caveolin-1 as indeed demonstrated at a biochemical level [45]. Together these

data may shed new light on the long lasting question about the significance of a TC versus a PC route of TEM [26, 27, 46].

Within this context, ephrinA4 could play an instrumental role in ensuring survival of the CLL cells linked to extravasation and lymphadenopathy, as summarized in Figure 8. In conclusion, our results provide new data on the survival mechanisms developed by CLL cells in vivo, demonstrating that extravasation could represent a disadvantageous event to be exploited for preventing nodal dissemination.

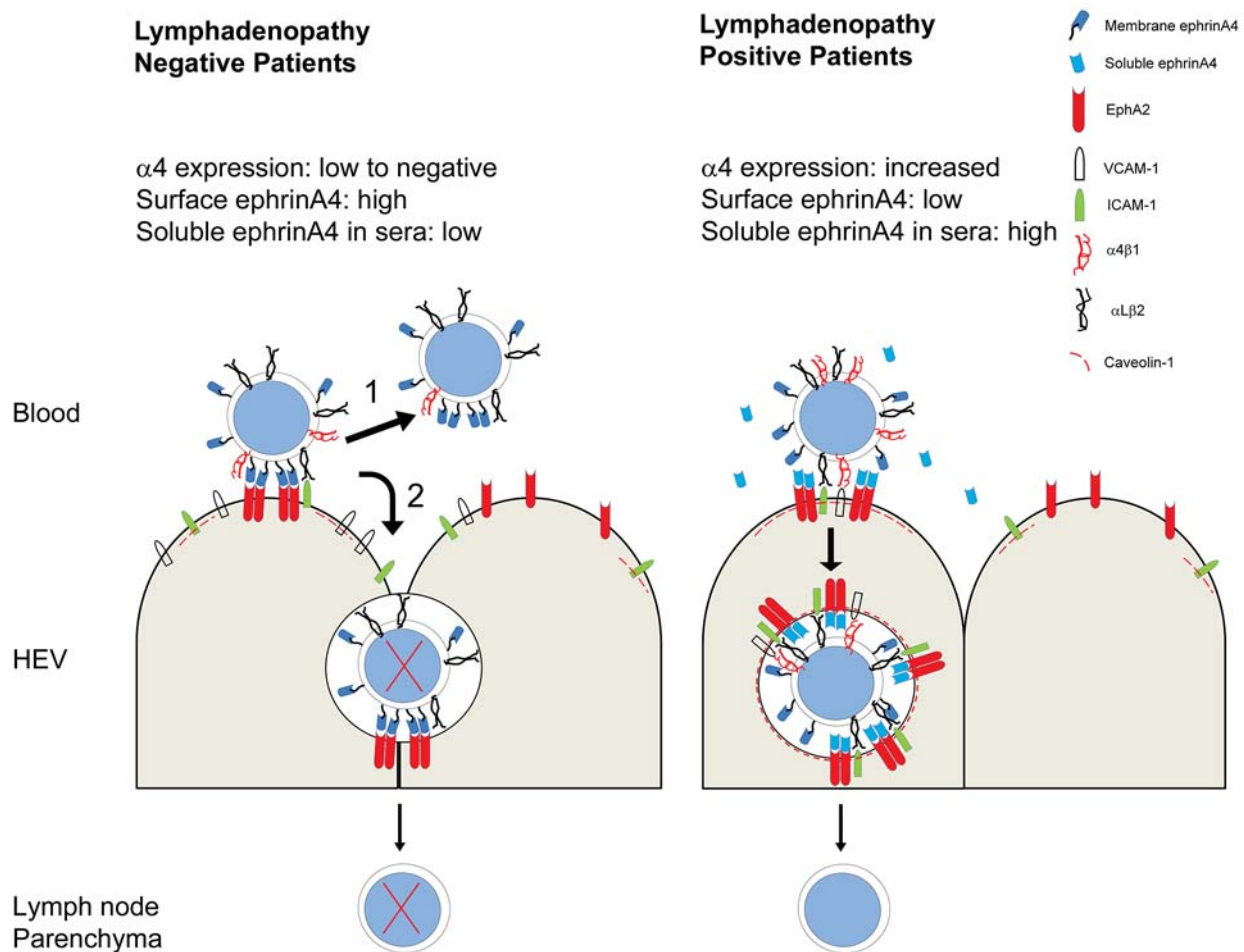


Figure 8: Summary of extravasation decisions and survival outcome of CLL cells according to lymphadenopathy condition determined by integrin and ephrinA4 mechanisms. In patients without lymphadenopathy (LAneg, left), CLL cells have low levels of $\alpha 4$ integrin expression impairing their extravasation but not adhesion to endothelium likely through $\alpha L \beta 2$. In these conditions, a low frequency of CLL cells extravasate between adjacent endothelial cells (paracellular TEM route) without receiving prosurvival signals and finally die (2). Most CLL cells, however, will detach from endothelium as a result of their high ephrinA4 expression on the cell surface allowing them to continue flowing within blood (1). The levels of soluble ephrinA4 in the sera of LAneg patients are not high enough to counteract the binding of the cell surface expressed one to endothelial EphA2 and detachment. In patients with lymphadenopathy (right) (LApas) expression of $\alpha 4$ integrin is high enough to allow extravasation. In these patients, CLL cell adhesion to endothelium is facilitated by low expression of ephrinA4 on their surface and the high levels of soluble isoform in sera which binds to endothelial EphA2. As a result, adhesion to endothelium will take place facilitating apoptotic signals which, nonetheless, are counteracted in the CLL cells that successfully bind to ICAM-1 and VCAM-1 induced upon EphA2 aggregation. A mechanism coupling EphA2 to caveolin-1 could promote a transcellular TEM route.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Investigation has been conducted in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki and national and international guidelines and has been approved by the authors' institutional review board.

Patients

Patients gave written informed consent before inclusion in this study. Research has been approved by the Ethics and Research Committees of Universidad Complutense de Madrid and H. Morales Meseguer of Murcia according to the principles embodied in the Declaration of Helsinki. The sample size was calculated prospectively for each one of the disease parameters to be studied (Power = 0.8; $\alpha < 0.05$; SPSS Sample Power 3, IBM). Under these criteria a total of 30 subjects were included (Table 1). FISH and IgHV gene mutational status analysis were performed according to previously published methods (Supplementary Material and Methods).

Blood samples were centrifuged onto density-gradient (Histopaque 1.077, Sigma-Aldrich) incubated with lineage specific antibodies (Abs) in PBS (mouse anti-CD3, -CD2, -CD56, -CD14 and -CD13 antigens; BD Biosciences, Europe, Spain) followed by MACS-conjugated anti-mouse secondary Abs (Miltenyi Biotech, Spain) before depletion in an AutoMACS separator (Miltenyi Biotech, Spain). CLL or B cells purities were $\geq 98\%$.

Fresh small fragments of lymphadenopathies were available from three patients (CLL patients n. 3, 18 and 28; Table 1) that were embedded in cryoprotective medium (TissueTeck, Leica) and snap-frozen in liquid N₂.

Transendothelial migration (TEM) assays

TEM assays were performed as previously described [16]. Briefly confluent monolayers of HUVECs (PromoCell, Spain) were grown onto the filters of transwell plates (96xwell transwell plates, 5 μ m pore size, Corning) and stimulated or not with TNF- α (10 ng/mL; PeProtech, Europe) for 4 hours. HUVEC were left by 6 hours in fresh medium without cytokine before addition of CLL or B cells onto them, for TEM assays, or in the bottom chambers for control suspension cultures (5×10^5 /well). At the indicated time-points, cells were harvested in PBS from the bottom and upper chambers (transmigrated (TM) or non-transmigrated (non-TM) cells in TEM assays, respectively). Where indicated, cellular density was increased in the bottom chambers through direct addition of CFSE fluorescently prestained CLL cells (5×10^5 /well) (5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester of fluorescein; 10 μ M; Thermofisher).

Where indicated, HUVEC monolayers or CLL suspensions were preincubated for 30 min with Fc fragments of human IgG (hFc; 1 μ g/mL; Jackson) in the presence or not of saturating amounts of hFc tagged recombinant extracellular domain dimers of human ephrinA4 (ephrinA4Fc; R&D) (0.5 μ g/mL; 30 min), EphA2 (EphA2Fc, 0.5 μ g/10⁶ cells), VCAM-1 (rhVCAM-1) (0.2 μ g/10⁶ cells) or ICAM-1 (rhICAM-1) (all from R&D). Saturating concentrations were determined by flow cytometry using an anti hFc or poly-His antibody as previously described [16].

Suspension cultures onto plate immobilized integrin ligands

Recombinant cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 (5 μ g/mL each) (R&D), extracellular matrix proteins (EMP) including fibronectin (FN, 10 μ g/mL), vitronectin (VN, 10 μ g/mL), laminin (LM, 10 μ g/mL), type I collagen (10 μ g/mL) (all from BD) or control protein (BSA; 5 μ g/mL; Sigma) were bound to the flat-surface of 96-well culture plates (96 \times multiwell culture plates, Corning) for 2 hours at 37°C. Where indicated CLL cell suspensions were incubated for 30 min with recombinant EphA2Fc (0.5 μ g/10⁶ cells) and purified hFc fragments of human Igs (1 μ g/10⁶ cells, Jackson) and extensively washed in culture medium before addition to culture wells (5×10^5 /well). All cultures were done in 200 μ l final volume of freshly prepared RPMI-1640 supplemented with pyruvate (1mM), L-Gln (1 mM) and 1 % FCS in a humidified incubator (5% CO₂, 37°C).

Coculture assays

Confluent monolayers of HUVEC were grown in multiwell plates (96x wells plastic culture plates, Corning). HUVEC activation was performed by providing 10ng/ml TNF α (PeProtech, Europe) to the culture medium for 4 hours followed by extensive washing in fresh medium without cytokine. TNF α activated or untreated HUVEC monolayers were used alive or fixed in 4% paraformaldehyde (PF) in PBS for 20 min followed by extensive washing in fresh medium. CLL cell suspensions (5×10^5 / well) were harvested from cocultures or control suspension cultures without HUVEC at the indicated time points by extensive washing in PBS containing 5 mM EDTA.

siRNA knock-down assays

Mixed siRNAs duplexes targeting different exons of *ephrinA4* (Supplementary Material and Methods) or negative control duplexes (Stealth RNAi negative control duplexes, medium-GC, Invitrogen) were nucleofected (300 nM) following manufacturer's recommendations (Amaxa, nucleofection reagents #4DV4XP-3024; 4D-Nucleofector X-unit). EphrinA4 protein knock-down

and CLL viability were analyzed by flow cytometry 48 hours postnucleofection.

Flow cytometry analysis

Cell suspensions were incubated with PE conjugated Annexin-V in HEPES buffer (ImmunoStep, Spain) followed by incubation with 7-AAD solution (5 µg/mL) until analysis in a four-color flow cytometer (FACScalibur, BD; Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre, UCM). Absolute cell counts were measured by flow cytometry. Briefly, total recovered cells were suspended in equivalent final volumes of PBS to which equivalent concentrations of fluorescent counting beads were added (CountBright absolute counting beads, ThermoFisher). Acquisition was performed at low speed for 1 min. Absolute cell counts were determined according to the following formula:

$$\left(\frac{\text{Number of B-cell events}}{\text{Number of bead events}} \right) \times \text{number of beads added}$$

For immunofluorescent staining cell suspensions were incubated in cold PBS [0.1% bovine serum albumin (BSA)] (2×10^5 cells/50 µL) with saturating amounts of antibodies to human antigens including: anti-CD19 (FITC, APC or PE), -CD5 (PECy5); FITC or PE-Cy5 anti-CD11a (α L); -CD29 (β 1), -CD18 (β 2) or -CD49d (α 4)(all from ImmunoStep, Spain); PE conjugated anti ZAP-70 or APC-CD38 (BD). Biotinylated goat-anti human ephrinA4 polyclonal Ab (R&D, Vitro, Spain) in the presence of purified goat IgG immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch, Europe) followed by streptavidin (SAV)-AlexaFluor-488 (Invitrogen).

Quantification of soluble ephrinA4 in serum by ELISA

Indirect ELISAs were carried out as previously described [18]. Briefly, plates (MaxiSorp Nunc-Immunoplates, Nunc) were preincubated with an anti-human ephrinA4 goat polyclonal antiserum (R&D) for antigen capture followed by addition of 100 µL serum samples diluted two to eightfold in binding buffer (TBS, 0.5% Tween 20). After 4h incubation, the bound ephrinA4 was detected by incubating wells with a biotinylated anti-ephrinA4 antibody followed by SAV-HRPO conjugate (Jackson-ImmunoResearch). Absorbance readings were at 405 nm (reference wavelength 492 nm) on a microplate reader (Bio-Tek Instruments). Standard curves were generated with serial dilutions of a recombinant human ephrinA4 (R&D) (ng/ml).

Integrin activation state and ligand binding assays

CLL cell suspensions (10^6 /mL) were preincubated for 30 min (37°C) in RPMI/2%FCS culture medium, with or without MnCl_2 (1mM), containing purified Fc

fragments of human IgG (Jackson). Next, cells were maintained in the same binding medium and incubated 30 min with recombinant human EphA2 (0.5 µg/ 10^6 cells). To detect activated VLA4, cells were incubated in cold PBS with PE-conjugated HUTS-21 mAb (Becton Dickinson). To analyze soluble ligand binding, VCAM-1-Fc were preclustered with a PE-conjugated affinity pure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, Fc gamma fragment specific (Jackson ImmunoResearch) before addition to the EphA2Fc-preincubated CLL cell suspensions.

Fluorescence microscopy studies

Fluorescence microscopy studies were performed, accordingly, onto 1) paraformaldehyde fixed (4% in PBS, 30 min) transwell filters from TEM assays, 2) acetone fixed (10 min) tissue cryo-sections from CLL lymphadenopathies (7 µm thick; Leica cryo-cutter, -22°C), 3) CLL cell suspensions adhered onto microscope slides and fixed in paraformaldehyde solution (4% in PBS, 30 min) or 4) CLL-HUVEC co-cultures in 16xwell glass chamber slides (Corning) as previously described [16]. FITC coupled TUNEL detection kit was used according to manufacturer recommendations (Roche). Immunofluorescence stainings were done in humidified chambers in 100 µl PBS (0.1%BSA) containing 0.1 µg/mL antibodies (Supplementary Material and Methods). Nuclei were counterstained with Hoechst (5 µg/mL, 10 min; Thermofisher). Samples were mounted with a non-fluorescent anti-fading mounting solution (ProlongGold, Thermofisher). Confocal images were acquired in a laser confocal microscope system (Leica, TCS SP2 AOBS; Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre, UCM).

Image analyses tools and procedures were performed with Image J (Supplementary Material and Methods).

Xenograft assays in mice

Germ-free BALB/c mice (Charles River Laboratories) were intravenously injected through the tail vein with CFSE prestained (10 µM, Thermofisher) human CLL cells (20×10^6 cells per mice) in 20 µl sterile PBS solution with or without different concentrations of ephrinA4 purified from serum of CLL patients (Supplementary Material and Methods). Animals were sacrificed by anesthesia 48 hours later and cell suspensions from surgically removed popliteal lymph nodes were stained with an APC conjugated anti mouse CD45 Ab (BD), Annexin-PE and 7AAD for flow cytometry analysis (10^7 total cells per staining). Human CLL cells were gated according to positivity for CFSE within the mouse CD45 negative cell population (Supplementary Figure S1). The minimum number of animals per experimental condition and CLL sample was prospectively calculated (SPSS Sample Power 3; power, 0.8; $\alpha < 0.05$). Animal studies

were approved by the Ethical and Research Committee in Animal Experimentation of the Complutense University of Madrid.

Statistical analysis

All in vitro assays were done in triplicate wells and results are shown as mean (\pm SD). Statistical analyses were performed in SPSS IBM or StatGraphics Centurion XVI. Spearman correlation coefficient was used to measure interrelatedness of variables and significance determined by using the Kruskal Wallis test. Normal distribution of data was determined by Shapiro-Wilks test. Normally distributed data were compared by paired or unpaired, accordingly, two-tailed Student's *t*-test [$*$, $P < 0.05$; $**$, $P < 0.01$; $***$, $P < 0.001$; ns, not statistically significant ($P \geq 0.05$)].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the patients who contributed to this work and to Drs. Alfonso Cortés, Juan José Muñoz, Amalia Vázquez and Carmen Hernández for technical advice and assistance in flow cytometry and fluorescence microscopy techniques (CAI Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, UCM).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Fondo de Investigaciones Sanitarias grant n. PI11/01976), Fundación Científica Eugenio Rodríguez Pascual (grant. FCERP 2014-2015), Asociación Española Contra el Cancer (AECC AIO 2013-2016) and the British Council School (BIOOR 2013-2016). P. Fortea is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Fondo de Investigaciones Sanitarias, TERCEL RD12/0019/0007). MA Flores is supported by the Mexican Ministry of Education (Chihuahua Autónoma University).

REFERENCES

1. Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol*. 2012; 24:643-649.
2. Ghia P, Chiorazzi N and Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008; 264:549-562.
3. Badoux X, Bueso-Ramos C, Harris D, Li P, Liu Z, Burger J, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ and Estrov Z. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Pathol*. 2011; 42:1989-2000.
4. Buggins AG, Pepper C, Patten PE, Hewamana S, Gohil S, Moorhead J, Folarin N, Yallop D, Thomas NS, Mufti GJ, Fegan C and Devereux S. Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res*. 2010; 70:7523-7533.
5. Long BW, Witte PL, Abraham GN, Gregory SA and Plate JM. Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:1416-1420.
6. Maffei R, Fiorcari S, Bulgarelli J, Martinelli S, Castelli I, Deaglio S, Debbia G, Fontana M, Coluccio V, Bonacorsi G, Zucchini P, Narni F, Torelli G, Luppi M and Marasca R. Physical contact with endothelial cells through beta1- and beta2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica*. 2011; 97:952-960.
7. Moreno A, Villar ML, Camara C, Luque R, Cespon C, Gonzalez-Porque P, Roy G, Lopez-Jimenez J, Bootello A and Santiago ER. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2001; 97:242-249.
8. McGettrick HM, Lord JM, Wang KQ, Rainger GE, Buckley CD and Nash GB. Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol*. 2006; 79:779-788.
9. Borthwick NJ, Akbar AA, Buckley C, Pilling D, Salmon M, Jewell AP and Yong KL. Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions. *Clin Exp Immunol*. 2003; 134:246-252.
10. Ferrero E, Belloni D, Contini P, Foglieni C, Ferrero ME, Fabbri M, Poggi A and Zocchi MR. Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation. *Blood*. 2003; 101:186-193.
11. Miyasaka M and Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:360-370.
12. Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, Desch P, Rubenzer G, Wollner S, Binsky I, Vallon-Eberhard A, Sapoznikov A, Burger M, Shachar I, Haran M, Honczarenko M, Greil R and Alon R. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res*. 2009; 69:3121-3130.
13. Till KJ, Lin K, Zuzel M and Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for

migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002; 99:2977-2984.

14. Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M and Cawley JC. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and $\alpha 4 \beta 1$ integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood*. 2005; 105:4813-4819.
15. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del Poeta G, Deaglio S, Gaidano G, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res*. 2009; 69:4001-4009.
16. Trinidad EM, Ballesteros M, Zuloaga J, Zapata A and Alonso-Colmenar LM. An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood*. 2009; 114:5081-5090.
17. Aasheim HC, Munthe E, Funderud S, Smeland EB, Beiske K and Logtenberg T. A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. *Blood*. 2000; 95:221-230.
18. Alonso-Colmenar LM, Trinidad EM, de Garcillan B, Ballesteros M, Castellanos M, Cotillo I, Munoz JJ and Zapata AG. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Res*. 2009; 33:395-406.
19. Trinidad EM, Zapata AG and Alonso-Colmenar LM. Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adh Migr*. 2010; 4:363-367.
20. Larson J, Schomberg S, Schroeder W and Carpenter TC. Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295:L431-439.
21. Daar IO. Non-SH2/PDZ reverse signaling by ephrins. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23:65-74.
22. Davids MS and Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol*. 2012; 3.
23. Schnoor M, Alcaide P, Voisin MB and van Buul JD. Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:946509.
24. Muller WA and Luscinskas FW. Assays of transendothelial migration in vitro. *Methods Enzymol*. 2008; 443:155-176.
25. Carman CV and Springer TA. A trans migratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*. 2004; 167:377-388.
26. Millan J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P and Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol*. 2006; 8:113-123.
27. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res*. 2009; 105:223-230.
28. Mionnet C, Sanos SL, Mondor I, Jorquera A, Laugier JP, Germain RN and Bajenoff M. High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood*. 2011; 118:6115-6122.
29. Burger JA. The CLL cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 792:25-45.
30. Plate JM, Long BW and Kelkar SB. Role of $\beta 2$ integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2000; 14:34-39.
31. Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M and Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 1999; 35:445-453.
32. Walsby E, Buggins A, Devereux S, Jones C, Pratt G, Brennan P, Fegan C and Pepper C. Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123:3607-3617.
33. Slattery MJ and Dong C. Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. *Int J Cancer*. 2003; 106:713-722.
34. Till KJ, Harris RJ, Linford A, Spiller DG, Zuzel M and Cawley JC. Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and $\alpha \text{L} \beta 2$ activation by chemokine. *Cancer Res*. 2008; 68:8429-8436.
35. Vincent AM, Cawley JC and Burthem J. Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996; 87:4780-4788.
36. Eksioglu-Demiralp E, Alpdogan O, Aktan M, Firatli T, Ozturk A, Budak T, Bayik M and Akoglu T. Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia*. 1996; 10:1331-1339.
37. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S and Del Poeta G. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 111:865-873.
38. Fiorcari S, Brown WS, McIntyre BW, Estrov Z, Maffei R, O'Brien S, Sivina M, Hoellenriegel J, Wierda WG, Keating MJ, Ding W, Kay NE, Lannutti BJ, Marasca R and Burger JA. The PI3-kinase delta inhibitor idelalisib (GS-1101) targets integrin-mediated adhesion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell to endothelial and marrow stromal cells. *PLoS One*. 2014; 8:e83830.
39. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C and Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998; 91:2387-2396.

40. Saito Y, Owaki T, Matsunaga T, Saze M, Miura S, Maeda M, Eguchi M, Tanaka R, Taira J, Kodama H, Goto S, Niitsu Y, Terada H and Fukai F. Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4. *J Biol Chem*. 2009; 285:7006-7015.
41. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM and Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*. 2001; 155:459-470.
42. Whitlock BB, Gardai S, Fadok V, Bratton D and Henson PM. Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *J Cell Biol*. 2000; 151:1305-1320.
43. Stupack DG. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death Differ*. 2005; 12:1021-1030.
44. Martinez-Moreno M, Leiva M, Aguilera-Montilla N, Sevilla-Movilla S, Isern de Val S, Arellano-Sanchez N, Gutierrez NC, Maldonado R, Martinez-Lopez J, Buno I, Garcia-Marco JA, Sanchez-Mateos P, Hidalgo A, Garcia-Pardo A and Teixido J. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia*. 2015.
45. Vihanto MM, Vindis C, Djonov V, Cerretti DP and Huynh-Do U. Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci*. 2006; 119:2299-2309.
46. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; 14:2522-2545.

